

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 443**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2006 E 10181638 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2343320**

54 Título: **Anticuerpos anti-GITR y usos de los mismos**

30 Prioridad:

25.03.2005 US 665322 P

03.06.2005 US 687265 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.03.2018

73 Titular/es:

**GITR, INC. (100.0%)
55 Cambridge Parkway, Suite 102
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**SMITH, L. MARY;
SZYMANSKA, GRAZYNA;
PONATH, PAUL;
ROSENZWEIG, MICHAEL y
PONTE, JOSE F.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 657 443 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-GITR y usos de los mismos

Antecedentes de la invención

5 Los miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral y de receptor de TNF (TNFR) regulan diversas funciones biológicas, incluyendo la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Usando presentación diferencial para identificar ARNm de linfocitos T inducidos por la hormona glucocorticoide sintética, dexametasona, Nocentini et al. ((1997) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94:6216-6221997) identificaron un ADNc de ratón que codifica un nuevo miembro de la familia de TNFR. El gen correspondiente se denominó GITR, para gen relacionado con la familia de TNFR inducido por glucocorticoides (también conocido como TNFRSF18). Al igual que otros TNFR, la proteína GITR predicha contiene repeticiones ricas en cisteína en el dominio extracelular. Además, el dominio intracelular de GITR comparte una homología significativa con los de los TNFR de ratón y humanos, 4-1BB y CD27. Nocentini et al. ((1997) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94:6216-6221997) demostraron que el gen de GITR se induce en linfocitos T mediante dexametasona, así como por otros estímulos activadores de células. La expresión de GITR protege a los linfocitos T de la apoptosis inducida por el tratamiento con anticuerpos anti-CD3, pero no por otros agentes apoptóticos.

15 Shimizu et al. ((2002) Nat Immunol 3:135-42) descubrieron que GITR se expresa principalmente en linfocitos T reguladores CD4+CD25+. Sin embargo, GITR también se expresa en linfocitos T CD4+ y CD8+ convencionales y su expresión se potencia rápidamente tras la activación. Los estudios *in vitro* han demostrado que GITR desempeña un papel clave en la tolerancia periférica que está mediada por estas células y anula la función supresora de los linfocitos T reguladores CD4+CD25+ (Shimizu et al. (2002) Nat Immunol 3:135-42; McHugh et al. (2002) Immunity 16:311-23). Kanamaru et al. ((2004) J Immunol 172: 7306-7314) proporcionaron pruebas de que GITR actúa como un coestimulador potente y único para una activación temprana de linfocitos T CD4+ usando un anticuerpo anti-GITR (DTA-1). El documento WO 03/006058 divulga un anticuerpo que se une a y modula GITR. El anticuerpo es útil en inmunoterapia y en el tratamiento y diagnóstico del cáncer.

25 Sería muy beneficioso el desarrollo de agentes útiles para modular la señalización a través de GITR.

Sumario de la invención

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

30 La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales aislados que se unen específicamente a GITR, por ejemplo, GITR humana (hGITR), en células, tales como linfocitos T y células dendríticas. Las moléculas de unión de la invención se caracterizan por su unión a hGITR con alta afinidad, son agonistas en presencia de CD3 y anulan la supresión de los linfocitos T efectores (Teff) por parte de los linfocitos T reguladores (Treg).

Un aspecto de la invención presenta una molécula de unión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, que comprende opcionalmente una secuencia líder.

35 En otro aspecto, la invención presenta una molécula de unión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, que comprende opcionalmente una secuencia líder.

En otro aspecto, la invención presenta una molécula de unión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, que comprende opcionalmente una secuencia líder.

Otro aspecto de la invención presenta una molécula de unión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, que comprende opcionalmente una secuencia líder.

40 Un aspecto de la invención presenta una molécula de unión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59, que comprende opcionalmente una secuencia líder.

En otro aspecto, la invención presenta una molécula de unión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, que comprende opcionalmente una secuencia líder.

45 En un aspecto, la invención presenta una molécula de unión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, que comprende opcionalmente una secuencia líder.

En otro aspecto, la invención presenta una molécula de unión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62, que comprende opcionalmente una secuencia líder.

Un aspecto de la invención presenta una molécula de unión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, que comprende opcionalmente una secuencia líder.

En un aspecto, el anticuerpo comprende las CDR mostradas en las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 y 8. En otro aspecto, el anticuerpo comprende las CDR mostradas en las SEQ ID NO: 3, 19, 5, 6, 7 y 8.

5 Un aspecto de la invención presenta un anticuerpo monoclonal aislado que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y que además comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Otro aspecto de la invención presenta un anticuerpo monoclonal aislado que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 y que además comprende una región variable de
10 cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En más de una realización, el anticuerpo comprende regiones marco de cadena pesada y ligera humanas o sustancialmente humanas. En otra realización, se mutan uno o más restos de aminoácidos de la región marco humana al resto de aminoácido murino correspondiente. En otra realización, la región constante comprende una región constante de cadena pesada de IgG2b. En otra realización, la región constante comprende una región constante de cadena pesada humana, por ejemplo, de IgG1 humana. En otra realización, se altera el anticuerpo para reducir la función efectora y/o la glucosilación. En una realización, la molécula de unión se une a GITR humana. En una realización, el anticuerpo no induce apoptosis. En otra realización, el anticuerpo no bloquea la reacción linfocitaria mixta primaria. En otra
15 realización más, el anticuerpo anula la supresión de los linfocitos T efectores por parte de los linfocitos T reguladores. En una realización, el anticuerpo modula la proliferación de linfocitos T efectores. En una realización, el anticuerpo es murino. En otra realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada de IgG2b murina. En una realización, la molécula de unión es un anticuerpo humanizado. En una realización adicional, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En otra realización más, el anticuerpo modula la actividad de GITR humana. En otra realización, el anticuerpo atenúa la degradación de I- κ B en linfocitos T.

25 El anticuerpo se une a GITR en linfocitos T humanos y en células dendríticas humanas y tiene una constante de unión (Kd) de 1×10^{-9} o menor. En una realización, el anticuerpo anula la supresión de los linfocitos T efectores por parte de los linfocitos T reguladores. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

La invención se refiere a un anticuerpo de la invención para su uso en un método para potenciar una respuesta inmunitaria existente o para inducir una respuesta inmunitaria inicial en un sujeto.

El anticuerpo comprende al menos seis CDR procedentes de la molécula de unión 6C8.

30 Otro aspecto de la invención presenta un anticuerpo que comprende las seis CDR mostradas en las SEQ ID NO: 3, 4 o 19, 5, 6, 7 y 8.

Otro aspecto más de la invención presenta un anticuerpo monoclonal aislado que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y que además comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En una realización, un anticuerpo comprende regiones marco de cadena pesada y ligera humanas o sustancialmente humanas. En otra
35 realización, un anticuerpo de la invención comprende regiones marco humanas en las que se retromutan uno o más aminoácidos de la región marco humana al resto de aminoácido murino correspondiente o se mutan a otro resto de aminoácido. En otra realización, un anticuerpo de la invención comprende una región constante de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, una región constante de cadena pesada de IgG2b. En otra realización más, el anticuerpo se une a GITR humana (hGITR). En una realización, el anticuerpo no induce apoptosis. En otra
40 realización, el anticuerpo no bloquea la reacción linfocitaria mixta primaria. En otra realización más, el anticuerpo anula la supresión de los linfocitos T efectores por parte de los linfocitos T reguladores. En una realización, el anticuerpo potencia la proliferación de linfocitos T efectores. En otra realización, el anticuerpo neutraliza la actividad de GITR humana. En otra realización más, el anticuerpo atenúa la degradación de I- κ B en linfocitos T.

45 El anticuerpo se une a GITR en linfocitos T humanos y en células dendríticas humanas y tiene una constante de unión (Kd) de 1×10^{-9} o menor. En una realización, el anticuerpo anula la supresión de los linfocitos T reguladores. En otra realización, el anticuerpo es murino o comprende CDR murinas. En una realización adicional, el anticuerpo comprende una cadena pesada de IgG2b. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En una realización adicional, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
50

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa una transferencia de SDS-PAGE de moléculas de unión a GITR humana y de ratón purificadas. Se cargaron doce microgramos de proteína por pocillo.

La figura 2 representa una cromatografía de exclusión por tamaños (SE-HPLC) de la molécula de unión a GITR

humana purificada. Se inyectaron cincuenta microgramos de proteína en la columna de SE-HPLC con un caudal de 0,6 ml/min. La pureza de las moléculas de unión mediante SE-HPLC proporcionó una población de moléculas de unión en las que un 99,8 % se encontraba en forma monomérica y un 0,2% de agregados.

5 **La figura 3** representa un análisis FACS de células L-M (fibroblastos de ratón) transfectados con el gen G1TR que se tiñeron con 50 µl de fluido de sobrenadante procedente de células de hibridoma que expresan G1TR. La molécula de unión a G1TR tiñó las células transfectadas con G1TR, pero no las células L-M no transfectadas.

La figura 4 representa un análisis FACS que demuestra que G1TR se expresa principalmente en linfocitos activados. Las moléculas de unión 6C8 tiñen a linfocitos CD4+, CD8+, CD25+ y tiñen muy débilmente a células CD103+.

10 **La figura 5** representa una curva de saturación de la unión de la molécula de unión 6C8, que se evaluó titulando 6C8 marcada con biotina en linfocitos activados CD3.

La figura 6 es una gráfica que muestra que la molécula de unión 6C8 es coestimuladora para linfocitos T que se estimulan con OKT3 subóptimo (anti-CD3; 0,01 µg/ml) y se incuban con anti-CD28 o anti-G1TR. También se usó un control de isotipo (IgG2b).

15 **Las figuras 7A y 7B** son gráficas que demuestran que la molécula de unión 6C8 no induce apoptosis. Los linfocitos se activaron con PHA durante 3 días antes de la adición de 10 µg/ml de YTH655 (un anticuerpo anti-CD2 que se sabe que induce apoptosis en linfocitos activados; Friend, P., et al. (1987) Transplant. Proc. 19:4317), 6C8 o un control de isotipo (IgG2b). La apoptosis se midió mediante recuentos de viabilidad celular (A) y tinción de anexina V (B) y midiendo la apoptosis mediante citometría de flujo.

20 **La figura 8** es una gráfica que demuestra que la molécula de unión 6C8 no bloquea una reacción linfocitaria mixta primaria (MLR). Los linfocitos de donantes allogénicos se mezclaron en presencia de TRX1 (anti-CD4 humano), 6C8 o MOPC (un control de isotipo para TRX1) a diversas concentraciones. Las células se incubaron durante 3 días y se sometieron a pulsos con ³H-timidina 18 horas antes de recoger y contar las células.

25 **La figura 9** es una gráfica que demuestra que la molécula de unión 6C8 bloquea la supresión de linfocitos T efectores por células Treg. Se añadieron células CD4+/CD25+ a células CD4+/CD25- a diversas proporciones. Las células se estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la placa. A proporciones de 1:1, se produjo inhibición de la proliferación de células CD4+/CD25-. La adición de 6C8 a dos diluciones diferentes fue capaz de bloquear la supresión de los linfocitos T CD4+ efectores inducida por los linfocitos T CD4+/CD25+ reguladores.

30 **La figura 10** es una gráfica que demuestra que la molécula de unión 6C8 es coestimuladora incluso cuando los linfocitos T se estimulan con anti-CD3 en ausencia de anti-CD28. Las células CD4+/CD25+ se incubaron con células CD4+/CD25- a diferentes proporciones celulares. Las células se estimularon únicamente con anti-CD3 unido a la placa. Se añadió 6C8 a las células y en estas condiciones, fue coestimulador.

La figura 11 es una gráfica que demuestra el efecto de anti-G1TR en la degradación de I-κB en linfocitos T CD3 activados.

35 **La figura 12** es una gráfica que demuestra el efecto de anti-G1TR en la fosforilación de I-κB en linfocitos T CD3 activados. **La figura 13** es una gráfica que demuestra el efecto de anti-G1TR en la degradación de I-κB, en linfocitos T CD3 más CD28 activados.

La figura 14 es una gráfica que demuestra el efecto de anti-G1TR en la fosforilación de I-κB, en linfocitos T CD3 más CD28 activados.

40 **La figura 15** que demuestra que 6C8 y el anticuerpo de R&D Systems (Minneapolis, MN) reconocen epítomos únicos. El ensayo de competición se llevó a cabo tanto en linfocitos OKT3 como Con A activados. Se usó un µg/ml de 6C8 con diversas cantidades del anticuerpo competidor de R&D Systems (anticuerpo monoclonal G1TR/TNFRSF18). Se observó cierto grado de competición a la concentración más elevada de anticuerpo, pero esto se debe con gran probabilidad a la impedancia estérica.

45 **La figura 16** muestra el análisis cinético del anticuerpo anti-G1TR 6C8 frente al anticuerpo para G1TR de R&D Systems. **La figura 17** es una gráfica que muestra el porcentaje de supervivencia de ratones a los que se inyectan células B16 tratadas con mitomicina C después de tratamiento con anticuerpo anti-G1TR (molécula de unión de rata 2F8 anti-G1TR de ratón).

50 **Las figuras 18A-18D** representan las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de la cadena pesada variable (VHD) (A y B, respectivamente) y la cadena ligera variable (VKA) (C y D, respectivamente) de la molécula de unión 6C8. Las secuencias líder se muestran en negra; las secuencias marco se encuentran subrayadas; las secuencias

de CDR se encuentran en cursiva.

Las figuras 19A y 19B son gráficas que muestran que 2F8 y los fragmentos F(ab')₂ de 2F8 potencian la respuesta humoral frente a HA.

Las figuras 20A y 20B son gráficas que muestran que 2F8 y los fragmentos F(ab')₂ de 2F8 potencian la respuesta humoral frente a Ova.

Descripción detallada de la invención

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Con el fin de que se pueda entender más fácilmente la presente invención, se definen previamente determinados términos.

10 I. Definiciones

15 La expresión "receptor de TNF inducido por glucocorticoides" (abreviado en el presente documento como "GITR"), también conocido como superfamilia 18 de receptor de TNF (TNFRSF18), tal como se usa en el presente documento, se refiere a un miembro de la familia de receptor de factor de necrosis tumoral/factor de crecimiento nervioso. Es una proteína transmembrana de tipo I de 241 aminoácidos caracterizada por tres pseudorepeticiones de cisteína en el dominio extracelular y protege de manera específica la apoptosis inducida por receptor de linfocitos T, aunque no protege a las células frente a otras señales apoptóticas, incluyendo el desencadenamiento por Fas, el tratamiento con dexametasona o la irradiación UV (Nocentini, G, et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94:6216-622). La secuencia de ácido nucleico de GITR humana (hGITR) se expone en la SEQ ID NO: 17 y la secuencia de aminoácidos se expone en la SEQ ID NO: 18.

20 La expresión "molécula de unión", tal como se usa en el presente documento, incluye moléculas que contienen al menos un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a GITR. Por "se une específicamente" se entiende que las moléculas de unión muestran esencialmente una unión de fondo a moléculas no de GITR. Sin embargo, una molécula de unión aislada que se une específicamente a GITR puede tener reactividad cruzada con moléculas de GITR de otras especies.

25 Las moléculas de unión de la invención pueden comprender una cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las moléculas de unión pueden tener una cadena tanto pesada como ligera. Tal como se usa en el presente documento, la expresión molécula de unión también incluye anticuerpos (incluyendo anticuerpos de longitud completa), anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos y fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos mediante una biblioteca de expresión de Fab, fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores y formas modificadas por ingeniería genética de anticuerpos, por ejemplo, moléculas scFv, en tanto que muestren la actividad deseada, por ejemplo, unión a GITR.

35 Un "antígeno" es una entidad (por ejemplo, una entidad proteica o un péptido) al que se une específicamente una molécula de unión.

40 El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une específicamente una molécula de unión. Los epítopos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como a partir de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente están preservados frente a la exposición a disolventes desnaturizantes mientras que los epítopos formados por el plegamiento terciario normalmente se pierden tras el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear en 2
45 dimensiones. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

50 Las moléculas de unión que reconocen el mismo epítipo pueden identificarse en un inmunoensayo sencillo que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, es decir, un ensayo de unión competitiva. La unión competitiva se determina en un ensayo en el que la molécula de unión que se está estudiando inhibe la unión específica de una molécula de unión de referencia a un antígeno común, tal como GITR. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo (RIA) directo o indirecto en fase sólida; inmunoensayo enzimático (EIA) directo o indirecto en fase sólida; ensayo de competición

en sándwich (véase Stahl et al., *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); EIA en fase sólida directa de biotina-avidina (véase, Kirkland et al., *J. Immuno.* 137:3614 (1986)); ensayo de marcaje directo en fase sólida, ensayo de tipo sándwich de marcaje directo en fase sólida (véase Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 1988); RIA de marcaje directo de fase sólida usando un marcaje de-125 (véase Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA en fase sólida directa de biotina-avidina (Cheung et al., *Virology* 176:546 (1990)); y RIA de marcaje directo. (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Típicamente, dicho ensayo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o a células que portan cualquiera de estos, una molécula de unión de ensayo no marcada y una molécula de unión de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o a las células en presencia de la molécula de unión de ensayo. Normalmente, la molécula de unión de ensayo está presente en exceso. Normalmente, cuando hay presente un exceso de molécula de unión competitiva, inhibirá la unión específica de una molécula de unión de referencia a un antígeno común en al menos un 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% o más.

Un epítipo también el reconocido por células inmunológicas, por ejemplo, linfocitos B y/o linfocitos T. El reconocimiento celular de un epítipo puede determinarse mediante ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente de antígeno, determinada mediante la incorporación de ³H-timidina, mediante secreción de citocinas, mediante secreción de anticuerpos o mediante eliminación dependiente de antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos).

La expresión "molécula de unión monoclonal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de unión obtenida a partir de una población de moléculas de unión sustancialmente homogéneas. Las moléculas de unión monoclonales son altamente específicas, dirigiéndose contra un solo sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de moléculas de unión policlonales, que normalmente incluyen diferentes moléculas de unión dirigidas contra diferentes determinantes (epítipos), cada molécula de unión monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter de la molécula de unión obtenida de una población sustancialmente homogénea de moléculas de unión y no debe interpretarse que necesite la producción de la molécula de unión mediante cualquier método particular. Por ejemplo, las moléculas de unión monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención pueden producirse mediante el método de hibridoma, descrito originariamente por Kohler, et al., *Nature* 256:495 (1975) o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567). Las "moléculas de unión monoclonales" también pueden aislarse a partir de fagotecas de anticuerpos usando las técnicas descritas en Clackson, et al., *Nature* 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol Biol.* 222:581-597 (1991), por ejemplo.

La expresión "molécula de unión quimérica" se refiere a una molécula de unión que comprende secuencias de aminoácidos procedentes de diferentes especies. Las moléculas de unión quiméricas pueden construirse, por ejemplo, por ingeniería genética, a partir de segmentos génicos de moléculas de unión que pertenecen a diferentes especies.

Las moléculas de unión monoclonales del presente documento incluyen específicamente moléculas de unión "quiméricas" en las que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en moléculas de unión procedentes de una especie concreta o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo concreta, mientras que el resto de las cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en moléculas de unión procedentes de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichas moléculas de unión, en tanto que muestren la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)), por ejemplo, unión a G1TR humana (hG1TR).

Las cadenas tanto ligeras como pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se usan de manera funcional. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de porciones tanto de cadena ligera (VL) como pesada (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad antigénica. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes, tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión a receptor de Fc, unión a complemento y similares. Por convención, la numeración de los dominios de región constante aumenta a medida que se encuentran más distantes del sitio de unión a antígeno o del extremo amino del anticuerpo. El extremo N-terminal es una región variable y el extremo C-terminal es una región constante; los dominios CH3 y CL comprenden, de hecho, el extremo carboxilo de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

Una "región variable", cuando se usa en referencia a una molécula de unión, se refiere a la porción amino terminal de una molécula de unión que confiere unión a antígeno a la molécula y que no es la región constante. El término incluye fragmentos funcionales de las mismas que mantienen parte o toda la función de unión de la región variable completa.

La expresión "región hipervariable", cuando se usa en el presente documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de una molécula de unión que son hipervariables en cuanto a su secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una "región determinante

de la complementariedad" o "CDR".

Tal como se usa en el presente documento, el término "CDR" o "región determinante de la complementariedad" significa los sitios de combinación con antígeno no contiguos hallados en la región variable de los polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. Estas regiones concretas se han descrito por Kabat, et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) y Kabat, et al., Sequences of proteins of immunological interest. (1991) y por Chothia, et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) y por MacCallum, et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) donde las definiciones incluyen restos de aminoácidos solapantes o subconjuntos de estos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquiera de las definiciones para referirse a una CDR de una molécula de unión o de una molécula de unión injertada o de variantes de las mismas se encuentra dentro del alcance del término, tal como se ha definido y se usa en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "región marco" o "FR" significa cada uno de los dominios de la cadena principal que están separados por las CDR. Por lo tanto, una región marco variable tiene entre aproximadamente 100-120 aminoácidos de longitud, pero se refiere únicamente a aquellos aminoácidos fuera de las CDR.

Las formas "humanizadas" de las moléculas de unión no humanas (por ejemplo, murinas) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima procedente de una molécula de unión no humana. En su mayoría, las moléculas de unión humanizadas son moléculas de unión humanas (molécula de unión aceptora/receptora) en las que se reemplazan los restos de una región hipervariable por restos de una región hipervariable de una especie no humana (molécula de unión donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se alteran los restos de la región marco (FR) de Fv de la molécula de unión humana, por ejemplo, se reemplazan, sustituyen o retromutan a los restos no humanos correspondientes. Además, las moléculas de unión humanizadas pueden comprender restos que no se encuentran en la molécula de unión receptora o en la molécula de unión donante. Generalmente, estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el rendimiento de la molécula de unión. En general, la molécula de unión humanizada comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno y típicamente dos dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una molécula de unión no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de molécula de unión humana. La molécula de unión humanizada también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante (Fc) de una molécula de unión, típicamente la de una molécula de unión humana. Para más detalles, véase Jones, et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann, et al., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

Preferentemente, una molécula de unión humanizada de la invención comprende al menos una CDR seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3 (GFSLSSTSGMGV (HC CDR1)), SEQ ID NO: 4 (HIWWDDDKYYNPSLKS (HC CDR2N)), SEQ ID NO: 5 (TRRYFPFAY (HC CDR3)), SEQ ID NO: 6 (KASQNVGTNVA (LC CDR1)), SEQ ID NO: 7 (SASYRYS (LC CDR2)), SEQ ID NO: 8 (QQYNTDPLT (LC CDR3)) y SEQ ID NO: 19 (HIWWDDDKYYQPSLKS (HC CDR2Q)).

La expresión molécula de unión "modificada por ingeniería genética" o "recombinante", tal como se usa en el presente documento, incluye moléculas de unión que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como moléculas de unión expresadas usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora, moléculas de unión aisladas de una biblioteca de moléculas de unión recombinantes combinatoria, moléculas de unión aisladas de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor, L.D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o moléculas de unión que se preparan, expresan, crean o aíslan mediante cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de moléculas de unión humanas con otras secuencias de ADN. En determinadas realizaciones, sin embargo, dichas moléculas de unión humanas recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de las moléculas de unión recombinantes son secuencias que, aunque proceden de y están relacionadas con secuencias de VH y VL de línea germinal humanas, pueden no existir en el repertorio de línea germinal de moléculas de unión humanas *in vivo*.

Una "molécula de unión aislada", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de unión que se encuentra sustancialmente libre de otras moléculas de unión que tengan especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, una molécula de unión que se une específicamente a GITR se encuentra sustancialmente libre de moléculas de unión que se unen específicamente a antígenos diferentes de GITR). Además, una molécula de unión aislada puede estar sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o agentes químicos. Una molécula de unión "aislada" es una que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural incluyen, por ejemplo, materiales que podrían interferir con usos de diagnóstico o terapéuticos de la molécula de unión y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, la molécula de unión se purificará (1) en más de un 95% en peso de molécula de unión, según se determina mediante el método de Lowry y lo más preferentemente, en más de un 99%

en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. Las moléculas de unión aisladas incluyen moléculas de unión *in situ* dentro de células recombinantes, ya que no estará presente al menos un compuesto del ambiente de la molécula de unión. Generalmente, sin embargo, las moléculas de unión aisladas se prepararán mediante al menos una etapa de purificación.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "constante de unión" ("kd"), también denominada "constante de afinidad", es una medida del alcance de una asociación reversible entre dos especies moleculares e incluye tanto la afinidad de unión real como la afinidad de unión aparente. La afinidad de unión real se determina calculando la relación de la K_{soc} en $M^{-1}S^{-1}$ a la K_{disoc} en S^{-1} y tiene las unidades " M^{-1} ". Por lo tanto, conferir u optimizar la afinidad de unión incluye alterar uno cualquiera o ambos de estos componentes para lograr el nivel deseado de afinidad de unión. La afinidad aparente puede incluir, por ejemplo, la avidéz de la interacción. Por ejemplo, un fragmento de unión de región variable heteromérica bivalente puede mostrar una afinidad de unión alterada u optimizada debido a su valencia. La afinidad de unión puede determinarse mediante medición de resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando un sistema BIAcore.

La expresión "molécula de ácido nucleico", tal como se usa en el presente documento, incluye moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero es, preferentemente, ADN bicatenario.

La expresión "molécula de ácido nucleico aislada", tal como se usa en el presente documento en referencia a ácidos nucleicos que codifican moléculas de unión que se unen a GTR, se refiere a una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias de nucleótido que codifican la molécula de unión están libres de otras secuencias de nucleótido que puedan flanquear de manera natural el ácido nucleico en el ADN genómico humano. Estas secuencias pueden incluir opcionalmente secuencias de nucleótidos 5' o 3' importantes para la regulación o la estabilidad de la proteína.

El término "vector", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde pueden ligarse segmentos de ADN adicionales al genoma viral. Determinados vectores son capaces de replicarse de manera autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora y de este modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se citan en el presente documento como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante se encuentran normalmente en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, los términos "plásmido" y "vector" pueden usarse de manera intercambiable, ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, la invención incluye dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus defectuosos para replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que tienen funciones equivalentes.

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que dichos términos pretenden hacer referencia no solo a la célula concreta, sino también a la descendencia de dicha célula. Debido a que pueden producirse determinadas mutaciones en generaciones posteriores debido a una mutación o a influencias ambientales, dicha descendencia, de hecho, puede no ser idéntica a la célula progenitora, pero aun así se incluyen dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora", tal como se usa en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "célula T" (es decir, linfocito T) incluye todas las células dentro del linaje de los linfocitos T, incluyendo timocitos, linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros y similares, procedentes de un mamífero (por ejemplo, ser humano). Preferentemente, los linfocitos T son linfocitos T maduros que expresan CD4 o CD8, pero no ambos y un receptor de linfocitos T. Las diversas poblaciones de linfocitos T descritas en el presente documento pueden definirse basándose en sus perfiles de citocinas y su función y son conocidas por los expertos en la materia.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "célula dendrítica" se refiere a células presentadoras de antígeno (APC) profesionales capaces de activar a linfocitos T vírgenes y estimular el crecimiento y la diferenciación de linfocitos B.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "linfocitos T vírgenes" incluye linfocitos T que no se han expuesto a antígenos afines y, por lo tanto, no son células activadas o de memoria. Los linfocitos T vírgenes no son

cicladados y los linfocitos T vírgenes humanos son CD45RA+. En caso de que los linfocitos T vírgenes reconozcan un antígeno y reciban señales adicionales dependiendo, pero sin limitación, de la cantidad de antígeno, la ruta de administración y el tiempo de administración, pueden proliferar y diferenciarse en diversos subconjuntos de linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T efectores.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "linfocito T efector" o "célula Teff" incluye linfocitos T que funcionan eliminando antígenos (por ejemplo, produciendo citocinas que modulan la activación de otras células o mediante actividad citotóxica). La expresión "linfocito T efector" incluye linfocitos T colaboradores (por ejemplo, células Th1 y Th2) y linfocitos T citotóxicos. Las células Th1 median las respuestas de hipersensibilidad de tipo retrasado y la activación de macrófagos, mientras que las células Th2 proporcionan ayuda a los linfocitos B y son críticos en las respuestas alérgicas (Mosmann y Coffman, 1989, Annu. Rev. Immunol. 7, 145-173; Paul y Seder, 1994, Cell 76, 241-251; Arthur y Mason, 1986, J. Exp. Med. 163, 774-786; Paliard, et al., 1988, J. Immunol. 141, 849-855; Finkelman, et al., 1988, J. Immunol. 141, 2335-2341).

- 15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "respuesta de tipo 1 T colaborador" (respuesta Th1), se refiere a una respuesta que se caracteriza por la producción de una o más citocinas seleccionadas entre IFN- γ , IL-2, TNF y linfotoxina (LT) y otras citocinas producidas preferencialmente o exclusivamente por células Th1 en lugar de por células Th2. Tal como se usa en el presente documento, una "respuesta de tipo 2 T colaborador" (respuesta Th2), se refiere a una respuesta de linfocitos T CD4+ que se caracteriza por la producción de una o más citocinas seleccionadas entre IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 y que se asocia con una eficiente "colaboración" con linfocitos B por parte de las células Th2 (por ejemplo, una producción de IgG1 y/o IgE potenciada).

- 20 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "linfocito T regulador" o "célula Treg" incluye linfocitos T que producen bajos niveles de IL-2, IL-4, IL-5 e IL-12. Los linfocitos T reguladores producen TNF α , TGF β , IFN- γ e IL-10, aunque a menores niveles que los linfocitos T efectores. Aunque el TGF β es la principal citocina producida por los linfocitos T reguladores, la citocina se produce a niveles menores o iguales a los producidos por células Th1 o Th2, por ejemplo, un orden de magnitud menor que en células Th1 o Th2. Los linfocitos T reguladores pueden encontrarse en la población de células CD4+CD25+ (véase, por ejemplo, Waldmann y Cobbold. 2001. Immunity. 14:399). Los linfocitos T reguladores suprimen de manera activa la proliferación y la producción de citocinas de células Th1, Th2 o linfocitos T vírgenes que se han estimulado en cultivo con una señal activadora (por ejemplo, antígeno y células presentadoras de antígenos o con una señal que imita el antígeno en el contexto del MHC, por ejemplo, anticuerpo anti-CD3, más anticuerpo anti-CD28).

- 30 Tal como se usa en el presente documento, el término "tolerancia" incluye refractividad a la estimulación mediada por receptor activador. Dicha refractividad es generalmente específica de antígeno y persiste tras haber cesado la exposición al antígeno causante de la tolerancia. Por ejemplo, la tolerancia se caracteriza por una ausencia de producción de citocinas, por ejemplo, IL-2 o puede evaluarse mediante el uso de un ensayo de cultivo de linfocitos mixtos. La tolerancia puede producirse frente a autoantígenos o frente a antígenos exógenos.

- 35 Un "cultivo de linfocitos mixtos" ("MLC") es un tipo de prueba de proliferación de linfocitos en la que se cultivan juntos linfocitos de dos individuos y se mide la respuesta proliferativa ("reacción linfocitaria mixta") mediante captación de timidina marcada con ^3H .

- 40 Tal como se usa en el presente documento, el término "apoptosis", también denominado muerte celular programada (PCD), es la muerte de una célula caracterizada por rasgos que incluyen, pero sin limitación, la condensación de la heterocromatina nuclear, encogimiento celular, condensación citoplasmática y en un estadio posterior de la apoptosis, escisión mediada por endonucleasas del ADN de la célula en fragmentos discretos. Tras el análisis electroforético del ADN de una célula en la que se ha producido apoptosis, puede ser evidente una "escalera" característica de fragmentos de ADN discretos.

- 45 "Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento pueden incluir aquellos que ya tienen un trastorno, así como aquellos que aún no tienen un trastorno.

Un "trastorno" es cualquier afección que podría beneficiarse del tratamiento con una molécula de unión de la presente invención. Esto incluye trastornos crónicos y agudos o enfermedades o patologías asociadas con respuestas inmunitarias que son demasiado elevadas o bajas.

- 50 Diversos aspectos de la invención se describen en más detalle en las siguientes subsecciones.

II. Moléculas de unión a GITR

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-GITR aislados. Las moléculas de unión ejemplares de la presente invención incluyen el anticuerpo 6C8. El anticuerpo 6C8 es un anticuerpo anti-GITR que

se une a G1TR en linfocitos T y células dendríticas, por ejemplo, linfocitos T y células dendríticas humanas, con alta afinidad. Preferentemente, dichas moléculas de unión anulan la supresión de las células Teff por células Treg y son agonistas para linfocitos T parcialmente activados *in vitro* en presencia de un agente estimulante, por ejemplo, CD3.

5 En una realización, el dominio VH de una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1. (dominio "N" de VH de 6C8, que incluye la secuencia líder). Se entenderá que, aunque algunas de las secuencias de las moléculas de unión descritas en el presente documento incluyen secuencias líder, una molécula de unión de la invención también puede excluir la secuencia líder, que es opcional. Por ejemplo, en una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de la proteína madura mostrada en la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, los aminoácidos 20-138 de la SEQ ID NO: 1.

En una realización, el dominio VH de una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 66. (dominio "Q" de VH de 6C8, que incluye la secuencia líder).

En una realización, el dominio VL de una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2. (dominio VH de 6C8, que incluye la secuencia líder).

15 En una realización, el dominio VH de una molécula de unión de la invención comprende los restos de aminoácido 20-138 de la SEQ ID NO: 1. (dominio "N" de VH de 6C8, sin la secuencia líder).

En una realización, el dominio VH de una molécula de unión de la invención comprende los restos de aminoácido 20-138 de la SEQ ID NO: 66. (dominio "Q" de VH de 6C8, sin la secuencia líder).

20 En una realización, el dominio VL de una molécula de unión de la invención comprende los restos de aminoácido 21-127 de la SEQ ID NO: 2. (dominio VH de 6C8, sin la secuencia líder).

En una realización de la invención, la cadena VL comprende una secuencia líder y/o de señal, es decir, los restos de aminoácido 1-20 de la SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 59). En una realización, la cadena VH comprende una secuencia líder y/o de señal, es decir, los restos de aminoácido 1-19 de la SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 64).

25 En una realización, una molécula de unión de la invención comprende un dominio VH que comprende una CDR expuesta en la SEQ ID NO: 3. (CDR1 de VH de 6C8).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende un dominio VH que comprende una CDR expuesta en la SEQ ID NO: 4. (CDR2-"N" de VH de 6C8).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende un dominio VH que comprende una CDR expuesta en la SEQ ID NO: 5. (CDR3 de VH de 6C8).

30 En una realización, una molécula de unión de la invención comprende un dominio VH que comprende una CDR expuesta en la SEQ ID NO: 19. (CDR2-alternativa "Q" de VH de 6C8).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende un dominio VL que comprende una CDR expuesta en la SEQ ID NO: 6. (CDR1 de VL de 6C8).

35 En una realización, una molécula de unión de la invención comprende un dominio VL que comprende una CDR expuesta en la SEQ ID NO: 7. (CDR2 de VL de 6C8).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende un dominio VL que comprende una CDR expuesta en la SEQ ID NO: 8. (CDR3 de VL de 6C8).

La invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos anteriores.

40 En una realización, el dominio VH de una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 9. (dominio "N" de VH de 6C8, que incluye la secuencia líder).

En una realización, el dominio VH de una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 65. (dominio "Q" de VH de 6C8, que incluye la secuencia líder).

45 En una realización, el dominio VH de una molécula de unión de la invención comprende los nucleótidos 58-414 de la SEQ ID NO: 9. (dominio "N" de VH de 6C8, sin la secuencia líder).

ES 2 657 443 T3

En una realización, el dominio VH de una molécula de unión de la invención comprende los nucleótidos 58-414 de la SEQ ID NO: 65. (dominio "Q" de VH de 6C8, sin la secuencia líder).

En una realización, el dominio VL de una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 10. (dominio VH de 6C8, que incluye la secuencia líder).

- 5 En una realización, el dominio VL de una molécula de unión de la invención comprende los nucleótidos 61-381 de la SEQ ID NO: 10. (dominio VH de 6C8, sin la secuencia líder).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende un dominio VH que comprende una CDR cuya secuencia de ácido nucleico se expone en la SEQ ID NO: 11. (CDR1 de VH de 6C8).

- 10 En una realización, una molécula de unión de la invención comprende un dominio VH que comprende una CDR cuya secuencia de ácido nucleico se expone en la SEQ ID NO: 12. (CDR2-"AAT" de VH de 6C8).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende un dominio VH que comprende una CDR cuya secuencia de ácido nucleico se expone en la SEQ ID NO: 13. (CDR3 de VH de 6C8).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende un dominio VH que comprende una CDR cuya secuencia de ácido nucleico se expone en la SEQ ID NO: 65. (CDR2-alternativa "CAA" de VH de 6C8).

- 15 En una realización, una molécula de unión de la invención comprende un dominio VL que comprende una CDR cuya secuencia de ácido nucleico se expone en la SEQ ID NO: 14. (CDR1 de VL de 6C8).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende un dominio VL que comprende una CDR cuya secuencia de ácido nucleico se expone en la SEQ ID NO: 15. (CDR2 de VL de 6C8).

- 20 En una realización, una molécula de unión de la invención comprende un dominio VL que comprende una CDR cuya secuencia de ácido nucleico se expone en la SEQ ID NO: 16. (CDR3 de VL de 6C8).

En una realización, el dominio CL de una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20. (región constante de cadena ligera de IgG2a murina).

En una realización, el dominio CH de una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21. (región constante de cadena pesada de IgG2a murina).

- 25 En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 22. (Quimérica-VL de 6C8/CL de IgG1 humana).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23. (Quimérica Gly-VH de 6C8/CH de IgG1 humana).

- 30 En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 24. (Quimérica Agly-VH de 6C8/CH de IgG1 humana).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 44. (VL de 6C8 humanizada).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 53. (VH "N" de 6C8 humanizada).

- 35 En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 54. (VH "Q" de 6C8 humanizada).

En una realización, el dominio CL de una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 55. (región constante de cadena pesada de IgG1 Gly humana).

- 40 En una realización, el dominio CH de una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 56. (región constante de cadena pesada de IgG1 Agly humana).

En una realización, el dominio CL de una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 57. (región constante de cadena ligera de IgG1 humana).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 58. (cadena ligera completa de 6C8 humanizada).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 60. (cadena pesada completa-HuN6C8-Gly de 6C8 humanizada).

- 5 En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 61. (cadena pesada completa-HuN6C8-Agly de 6C8 humanizada).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 62. (cadena pesada completa-HuQ6C8-Gly de 6C8 humanizada).

- 10 En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 63. (cadena pesada completa-HuQ6C8-Agly de 6C8 humanizada).

En una realización, una molécula de unión de la invención tiene secuencias VL y VH, tal como se muestran en las figuras 18A-18D; la secuencia de aminoácidos de la región VH de 6C8 también se muestra en la SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos de la región VL de 6C8 se muestra en la SEQ ID NO: 2. En otra realización, una molécula de unión de la invención tiene secuencias LC y HC, tal como se exponen en las SEQ ID NO: 20 y 21;

ADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS
WTDQDSKDYMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRE (SEQ
ID NO:20);

AKTTPPSVYPLAPGCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSSVHTFPA
LLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDDKLEPSGPISTINPCPP
CKECKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMISLTPKVTQVVDVSEDDPDVQISWF
VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPSPI
ERTISKIKGLVRAQVYILPPPAAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTE
ENYKDTAPVLDSGYSFYISKLNMKTSKWEKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKKTIS
RSPGK (SEQ ID NO:21).

- 15 En una realización de la invención, la cadena VL comprende una secuencia líder y/o de señal, por ejemplo, los restos de aminoácido 1-20 de la SEQ ID NO: 2. En una realización, la cadena VH comprende una secuencia líder y/o de señal, por ejemplo, los restos de aminoácido 1-19 de la SEQ ID NO: 1. En otra realización, una molécula de unión de la invención no comprende una secuencia líder y/o de señal.

- 20 En un aspecto, la invención se refiere a moléculas de unión 6C8 y a otras moléculas de unión con propiedades equivalentes a 6C8, tales como unión de alta afinidad a GITR y anulación de la supresión de células Teff por células Treg. Además, las moléculas de unión de la invención no inducen apoptosis, ni tampoco inhiben una reacción linfocitaria mixta. Por consiguiente, las moléculas de unión equivalentes de la invención son agonistas de GITR, es decir, producen señalización a través de GITR. GITR es un miembro de la superfamilia de TNFR. Al estar los
25 miembros de la familia de TNFR en la supervivencia y la apoptosis celular mediante la señalización a través de NF- κ B, en una realización, las moléculas de unión de la presente invención atenúan la degradación de I- κ B.

- En una realización, la invención proporciona moléculas de unión a hGITR aisladas con una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y opcionalmente una secuencia líder y una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y
30 opcionalmente una secuencia líder. En determinadas realizaciones, una molécula de unión comprende una región constante de cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Además, la molécula de unión puede comprender una región constante de cadena ligera, ya sea una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda. Preferentemente, la molécula de unión comprende una región constante de cadena ligera kappa. En una realización, una molécula de unión de la
35 invención comprende una región constante de cadena ligera tal como se expone en la SEQ ID NO: 20. En una realización, una molécula de unión de la invención comprende una región constante de cadena pesada tal como se

5 expone en la SEQ ID NO: 21. En una realización, una molécula de unión de la invención comprende una región constante de cadena pesada tal como se expone en la SEQ ID NO: 55. En una realización, una molécula de unión de la invención comprende una región constante de cadena pesada tal como se expone en la SEQ ID NO: 56. En una realización, una molécula de unión de la invención comprende una región constante de cadena pesada tal como se expone en la SEQ ID NO: 57.

10 En otra realización, la invención proporciona una molécula de unión que tiene dominios CDR de VL relacionados con 6C8, por ejemplo, moléculas de unión con una región variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos un dominio CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8. En otra realización, una región variable de cadena ligera (VL) tiene al menos dos dominios CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8. En otra realización más, una región variable de cadena ligera (VL) tiene dominios CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos que consisten en la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8.

15 En otras realizaciones más, la invención proporciona una molécula de unión que tiene dominios CDR de VH relacionados con 6C8, por ejemplo, moléculas de unión con una región variable de cadena ligera (VH) que tiene un dominio CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 19. En otra realización, una región variable de cadena pesada (VH) tiene al menos dos dominios CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 19. En otra realización más, una región variable de cadena pesada (VH) tiene dominios CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos que consisten en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 19.

25 En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos una CDR procedente de una molécula de unión anti-GITR humana, por ejemplo, una molécula de unión 6C8. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "procedente de" una proteína concreta se refiere al origen del polipéptido. En una realización, el polipéptido o la secuencia de aminoácidos que procede de un polipéptido de partida concreto es una secuencia de CDR o una secuencia relacionada con la misma. En otra realización, el polipéptido o la secuencia de aminoácidos que procede de un polipéptido de partida concreto es una secuencia de FR o una secuencia relacionada con la misma. En una realización, la secuencia de aminoácidos que procede de un polipéptido de partida concreto no es contigua.

30 Por ejemplo, en una realización, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR proceden de un anticuerpo 6C8 murino. En una realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos una CDR de cadena pesada o ligera de un anticuerpo murino 6C8. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos dos CDR de un anticuerpo murino 6C8. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos tres CDR de un anticuerpo murino 6C8. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos cuatro CDR de un anticuerpo murino 6C8. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos cinco CDR de un anticuerpo murino 6C8. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos seis CDR de un anticuerpo murino 6C8.

40 Un experto en la materia también entenderá que puede modificarse una molécula de unión de la invención de tal forma que varía en cuanto a su secuencia de aminoácidos respecto de la molécula 6C8 de la que procede. Por ejemplo, pueden efectuarse sustituciones de nucleótidos o aminoácidos que dan lugar a sustituciones o cambios conservativos en restos de aminoácido "no esenciales" (por ejemplo, en restos de CDR y/o marco) y conservan la capacidad para unirse a GITR, por ejemplo, GITR humana.

45 En una realización, la al menos una CDR (o al menos una CDR de las más de una CDR de 6C8 que están presentes en la molécula de unión) se modifica para variar la secuencia respecto de la CDR de una molécula de unión 6C8 de origen natural, y aún conserva la capacidad de unión de 6C8. Por ejemplo, en una realización, se modifican una o más CDR de un anticuerpo 6C8 para eliminar sitios de glucosilación potenciales. Por ejemplo, al ser la secuencia de aminoácidos Asn-X-(Ser/Thr) una secuencia consenso putativa para un sitio de glucosilación que puede afectar a la producción de la molécula de unión y la CDR2 de la cadena pesada de 6C8 tiene la secuencia Asn-Pro-Ser, se preparó una segunda versión de la cadena pesada para sustituir de manera conservativa una asparagina (Asn) por una glutamina (Gln) en el resto de aminoácido 62 de la SEQ ID NO: 53.

55 En una realización, una molécula de unión de la invención comprende un polipéptido o una secuencia de aminoácidos que es esencialmente idéntica a la del anticuerpo 6C8 o una porción del mismo, en donde la porción consiste en al menos 3-5 aminoácidos, al menos 5-10 aminoácidos, al menos 10-20 aminoácidos, al menos 20-30 aminoácidos o al menos 30-50 aminoácidos o que de otro modo un experto en la materia puede identificar que tiene su origen en la secuencia de partida.

En otra realización, el polipéptido o la secuencia de aminoácidos que procede un polipéptido de partida particular o

la secuencia de aminoácidos comparte una identidad de secuencia de aminoácidos que es de aproximadamente el 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o que de otro modo un experto en la materia puede identificar que tiene su origen en la secuencia de partida.

5 Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una variante no natural de un polipéptido puede crearse introduciendo una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la molécula de unión, de tal forma que se introducen una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones en la proteína codificada. Las mutaciones pueden introducirse mediante técnicas convencionales, tales como mutagénesis de sitio dirigido y mutagénesis mediada por la PCR. En una realización, se efectúan mutaciones conservativas en uno o más restos de aminoácido no esenciales. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que se reemplaza el resto de aminoácido por un resto de aminoácido que tenga una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, puede reemplazarse un resto de aminoácido no esencial en un polipéptido de molécula de unión por otro resto de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. En otra realización, puede reemplazarse una serie de aminoácidos por una serie estructuralmente similar que difiere en cuanto a su orden y/o composición de miembros de la familia de cadena lateral.

Como alternativa, en otra realización, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de la totalidad o parte de la secuencia codificante de la molécula de unión.

25 Las moléculas de unión preferidas de la invención comprenden secuencias de aminoácidos de regiones marco y constantes procedentes de una secuencia de aminoácidos humana. Sin embargo, las moléculas de unión pueden comprender secuencias de región marco y/o constantes procedentes de otras especies de mamífero. Por ejemplo, puede incluirse una región marco de primate (por ejemplo, primate no humano), una porción de cadena pesada y/o una porción bisagra en las presentes moléculas de unión. En una realización, puede estar presente uno o más aminoácidos en la región marco de un polipéptido de unión, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de marco humano o de primate no humano puede comprender una o más sustituciones y/o retromutaciones de aminoácidos en la que está presente el resto de aminoácido murino correspondiente. Las moléculas de unión preferidas de la invención son menos inmunogénicas que el anticuerpo murino 6C8 de partida.

35 La presente invención también presenta moléculas de unión quiméricas y/o humanizadas (es decir, inmunoglobulinas quiméricas y/o humanizadas) específicas para GITR. Las moléculas de unión quiméricas y/o humanizadas tienen una especificidad y afinidad de unión igual o similar a la de moléculas de unión de ratón u otras no humanas que proporcionan el material de partida para la construcción de una molécula de unión quimérica o humanizada.

40 Una molécula de unión quimérica es una cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido, típicamente por ingeniería genética, a partir de segmentos génicos de inmunoglobulinas que pertenecen a especies diferentes. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes de una molécula de unión monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes (C) humanos, tales como IgG1 o IgG4. Se prefiere el isotipo IgG1 humano. Por lo tanto, una molécula de unión quimérica ejemplar es una proteína híbrida que consiste en el dominio V o de unión a antígeno de una molécula de unión de ratón y el dominio C o efector de una molécula de unión humana.

45 En una realización, la invención se refiere a regiones variables humanizadas de la molécula de unión 6C8 y a polipéptidos que comprenden dichas regiones variables humanizadas. En una realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos una región variable de la molécula de unión 6C8, por ejemplo, una región variable de cadena ligera o de cadena pesada.

50 La expresión "molécula de unión humanizada" se refiere a una molécula de unión que comprende al menos una cadena que comprende restos de marco de región variable procedentes de una cadena de molécula de unión humana (citada como la inmunoglobulina o molécula de unión aceptora) y al menos una región determinante de la complementariedad procedente de una molécula de unión de ratón, (citada como la inmunoglobulina o molécula de unión donante). Las moléculas de unión humanizada pueden producirse usando tecnología de ADN recombinante, que se describe más adelante. Véase, por ejemplo, Hwang, W.Y.K., et al. (2005) *Methods* 36:35; Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1989), 86:10029-10033; Jones et al., *Nature*, (1986), 321:522-25; Riechmann et al., *Nature*, (1988), 332:323-27; Verhoeyen et al., *Science*, (1988), 239:1534-36; Orlandi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1989), 86:3833-37; Patentes de los Estados Unidos n.º US 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 6.180.370, Selick et al., documento WO 90/07861 y Winter, documento 5.225.539. Las regiones constantes, en caso de estar presentes, preferentemente proceden de una inmunoglobulina humana.

Cuando se ha seleccionado una molécula de unión donante no humana para su humanización, puede obtenerse una molécula de unión aceptora humana adecuada, por ejemplo, a partir de bases de datos de secuencia de genes de anticuerpo humanos expresados, a partir de secuencias de Ig de línea germinal o una secuencia consenso de varias moléculas de unión humanas.

- 5 En una realización, se usa un método basado en la homología de la CDR para la humanización (véase, por ejemplo, Hwang, W.Y.K., et al. (2005) *Methods* 36:35). Este método implica generalmente la sustitución de las CDR de ratón en un marco de dominio variable humano basándose en CDR de ratón y humanas estructuradas de un modo similar en lugar de marcos de ratón y humanos estructurados de un modo similar. La similitud de las CDR de ratón y humano se determina generalmente identificando genes humanos del mismo tipo de cadena (ligera o pesada) que
10 tienen la misma combinación de estructuras de CDR canónicas que las moléculas de unión de ratón y, por lo tanto, conservan la conformación tridimensional de los armazones peptídicos de las CDR. En segundo lugar, para cada uno de los genes variables candidatos con estructuras canónicas coincidentes, se evalúa la homología entre las CDR de ratón y las candidatas humanas resto a resto. Finalmente, para generar una molécula de unión humanizada, los restos de CDR de la CDR candidata humana que aún no son idénticos a la CDR de ratón se convierten en la
15 secuencia de ratón. En una realización, no se introducen mutaciones del marco humano en la molécula de unión humanizada.

En una realización, las secuencias de línea germinal humanas se evalúan respecto de su homología de CDR con las CDR de la molécula de unión a G1TR. Por ejemplo, para el anticuerpo murino 6C8, se compararon todos los genes V de cadena ligera kappa de línea germinal con una estructura canónica 2-1-1 en la base de datos IMGT con la
20 secuencia del anticuerpo 6C8. Esto mismo se efectuó para la cadena pesada, donde se compararon todos los genes V de cadena pesada de línea germinal 3-1 con la secuencia de aminoácidos de 6C8. Por consiguiente, en una realización, una molécula de unión de la invención comprende un marco de región V de cadena kappa humana con una estructura canónica 2-1-1. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende un marco de región V de cadena pesada humana con una estructura canónica 3-1.

- 25 Se identificaron las siguientes secuencias de línea germinal de cadena ligera humana potenciales y pueden incorporarse en una molécula de unión de la invención:

El número de referencia de IMGT del gen IGKV3-15 es M23090. La secuencia de aminoácidos es:

**EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTR
ATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWP (SEQ ID NO:25).**

El número de referencia de IMGT del gen IGKV3D-11 es X17264. La secuencia de aminoácidos es:

**EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGPGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWH (SEQ ID NO:26).**

Existen dos alelos del gen IGKV3-11. El número de referencia de IMGT del alelo *01 del gen IGKV3-11 es X01668. La secuencia de aminoácidos es:

**EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWP (SEQ ID NO:27).**

El número de referencia de IMGT del alelo *02 del gen IGKV3-11 es K02768. La secuencia de aminoácidos es:

**EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGRDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWP (SEQ ID NO:28).**

El número de referencia de IMGT del gen IGKV1D-43 es X72817. La secuencia de aminoácidos es:

AIRMTQSPFSLASVGDRVTITCWASQGISSYLAWYQQKPAKAPKLFIIYASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTP (SEQ ID NO:29).

Existen dos alelos del gen IGKV1-39. El número de referencia de IMGT del alelo *01 del gen IGKV1-39 es X59315. La secuencia de aminoácidos es:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP (SEQ ID NO:30).

5 El número de referencia de IMGT del alelo *02 del gen IGKV1-39 es X59318. La secuencia de aminoácidos es:

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQCGYSTP (SEQ ID NO:31).

El número de referencia de IMGT del gen IGKV1-33 es M64856. La secuencia de aminoácidos es:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLE
TGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYDNLP (SEQ ID NO:32).

El número de referencia de IMGT del gen IGKV1-27 es X63398. La secuencia de aminoácidos es:

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDVATYYCQKYN SAP (SEQ ID NO:33).

Existen dos alelos del gen IGKV1-17. El número de referencia de IMGT del alelo *01 del gen IGKV1-17 es X72808. La secuencia de aminoácidos es:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYP (SEQ ID NO:34).

El número de referencia de IMGT del alelo *02 del gen IGKV1-17 es D88255. La secuencia de aminoácidos es:

15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFATYYCLQHNSYP (SEQ ID NO:35).

Existen dos alelos del gen IGKV1D-16. El número de referencia de IMGT del alelo *01 del gen IGKV1D-16 es K01323. La secuencia de aminoácidos es:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYP (SEQ ID NO:36).

El número de referencia de IMGT del alelo *02 del gen IGKV1D-16 es J00244. La secuencia de aminoácidos es:

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYP (SEQ ID NO:37).

El número de referencia de IMGT del gen IGKV1-16 es J00248. La secuencia de aminoácidos es:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYP (SEQ ID NO:38).

Existen dos alelos del gen IGKV1-12. El número de referencia de IMGT del alelo *01 del gen IGKV1-12 es V01577. La secuencia de aminoácidos es:

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP (SEQ ID NO:39).

5

El número de referencia de IMGT del alelo *02 del gen IGKV1-12 es V01576. La secuencia de aminoácidos es:

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP (SEQ ID NO:40).

El número de referencia de IMGT del gen IGKV1-9 es Z00013. La secuencia de aminoácidos es:

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQ
SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYP (SEQ ID NO:41).

10 El número de referencia de IMGT del gen IGKV1-6 es M64858. La secuencia de aminoácidos es:

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNYP (SEQ ID NO:42).

Existen tres alelos del gen IGKV1-5. El número de referencia de IMGT del alelo *01 del gen IGKV1-5 es Z00001. La secuencia de aminoácidos es:

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLE
SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSYS (SEQ ID NO:43).

15 Se identificaron las siguientes secuencias de línea germinal de cadena pesada humana potenciales y pueden incorporarse en una molécula de unión de la invención:

Existen diez alelos del gen IGHV2-5. El número de referencia de IMGT del alelo *01 del gen IGHV2-5 es X62111. La secuencia de aminoácidos es:

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALEWLALIYW
NDDKRYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYY (SEQ ID NO:45).

20 El número de referencia de IMGT del gen IGHV2-26 es M99648. La secuencia de aminoácidos es:

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFS
NDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDTATYYCARI (SEQ ID
NO:46).

Existen trece alelos del gen IGHV2-70. El número de referencia de IMGT del alelo *01 del gen IGHV2-70 es L21969. La secuencia de aminoácidos es:

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMVCVSWIRQPPGKALEWLALID
WDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCARI (SEQ ID
NO:47).

- 5 Existen cuatro alelos del gen IGHV4-30-2. El número de referencia de IMGT del alelo *01 del gen IGHV4-30-2 es L10089. La secuencia de aminoácidos es:

QLQLQESGSLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGGYSWSWIRQPPGKGLEWIGYIYH
SGSTYYNPSLKSRVTISVDRSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID
NO:48).

Existen seis alelos del gen IGHV4-30-4. El número de referencia de IMGT del alelo *01 del gen IGHV4-30-4 es Z14238. La secuencia de aminoácidos es:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYY
SGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID
NO:49).

10

Existen diez alelos del gen IGHV4-31. El número de referencia de IMGT del alelo *01 del gen IGHV2-5 es L10098. La secuencia de aminoácidos es:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPPGKGLEWIGYIY
YSGSTYYNPSLKSLVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID
NO:50).

15

Existen seis alelos del gen IGHV4-39. El número de referencia de IMGT del alelo *01 del gen IGHV4-39 es L10094. La secuencia de aminoácidos es:

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYS
GSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO:51).

Existen ocho alelos del gen IGHV4-61. El número de referencia de IMGT del alelo *01 del gen IGHV4-61 es M29811. La secuencia de aminoácidos es:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIY
YSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID
NO:52).

Puede usarse cada una de estas secuencias de línea germinal para proporcionar regiones marco para su uso con una o más CDR de 6C8.

Tal como se usa en el presente documento, las "estructuras canónicas" son conformaciones de bucles hipervariables conservadas formadas por las diferentes CDR mediante las cuales la molécula de unión forma los contactos con el antígeno. La asignación de clases de estructura canónica a una nueva molécula de unión puede lograrse usando programas informáticos públicamente disponibles.

En otra realización, la sustitución de las CDR de ratón en un marco de dominio variable humano está basado en la retención de la correcta orientación espacial del marco de dominio variable humano identificando marcos de dominio variable humanos que conservarán la misma conformación que los marcos de dominio variable de ratón de los que proceden las CDR. En una realización, esto se logra obteniendo los dominios variables humanos de las moléculas de unión humanas cuyas secuencias marco muestran un alto grado de identidad de secuencia respecto de los dominios marco variables murinos de los que proceden las CDR. Véase Kettleborough et al., Protein Engineering 4:773 (1991); Kolbinger et al., Protein Engineering 6:971 (1993) y Carter et al., documento WO 92/22653.

Preferentemente, la molécula de unión aceptora humana conserva los restos canónicos y de la interfaz de la molécula de unión donante. Además, la molécula de unión aceptora humana tiene preferentemente una similitud sustancial en la longitud de los bucles de CDR. Véase Kettleborough et al., Protein Engineering 4:773 (1991); Kolbinger et al., Protein Engineering 6:971 (1993) y Carter et al., documento WO 92/22653.

En otra realización, pueden seleccionarse secuenciasceptoras humanas adecuadas basándose en la homología con las regiones marco de la molécula de unión 6C8. Por ejemplo, puede compararse la secuencia de aminoácidos de la molécula de unión 6C8 con la secuencia de aminoácidos de otras moléculas de unión conocidas, por ejemplo, comparando las regiones FR o las secuencias de región variable de la secuencia de aminoácidos de 6C8 frente a una base de datos disponible públicamente de moléculas de unión conocidas y seleccionando aquellas secuencias con el mayor porcentaje de identidad de aminoácidos en la región variable o FR, es decir, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%. En una realización, puede usarse la secuencia marco expuesta en la SEQ ID NO: 67 (**QVTLKESGPGILQPSQTLTSLTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLA** HIWWDDDKYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTRDTATYYCARTRRYFPFAYWGEGTSVTVTS (SEQ ID NO: 67; los restos del marco están en negrita)). En otra realización, puede usarse la secuencia marco expuesta en la SEQ ID NO: 68 (**QVTLRESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTSGMGVGVIRQPPGKALEWLAHIWWDDDKYNPSLK** SRLTISKDTSKNQVLTMTNMPDVTATYYCARTRRY FPFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 68; los restos del marco están en negrita)).

Habiéndose identificado las regiones determinantes de la complementariedad de la inmunoglobulina donante murina y las inmunoglobulinasceptoras humanas adecuadas, la siguiente etapa es determinar qué restos de estos componentes, en caso de haberlos, deberían sustituirse para optimizar las propiedades de la molécula de unión humanizada resultante. En general, debería minimizarse la sustitución de restos de aminoácidos humanos por murinos, ya que la introducción de restos murinos aumenta el riesgo de que la molécula de unión desencadena una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) en seres humanos. Pueden llevarse a cabo métodos reconocidos en la técnica para determinar la respuesta inmunitaria para monitorizar una respuesta de tipo HAMA en un paciente particular o durante ensayos clínicos. Puede efectuarse una evaluación de la inmunogenicidad en pacientes a los que se administran las moléculas de unión humanizadas al comienzo y durante la administración de dicha terapia. La respuesta de tipo HAMA se mide, por ejemplo, detectando anticuerpos contra el reactivo terapéutico humanizado, en muestras de suero del paciente, usando un método conocido por un experto en la materia, incluyendo tecnología de resonancia de plasmón superficial (BIACORE) y/o análisis ELISA en fase sólida.

Cuando sea necesario, pueden cambiarse o sustituirse uno o más restos en las regiones marco humanas a restos en las posiciones correspondientes en el anticuerpo murino para conservar la afinidad de unión del anticuerpo humanizado por el antígeno. Este cambio en ocasiones se denomina "retromutación". Determinados aminoácidos de los restos de marco de región variable humana se seleccionan para su retromutación basándose en su posible influencia en la conformación y/o la unión al antígeno de la CDR. La colocación de regiones CDR murinas con región marco variable humana puede dar como resultado limitaciones conformacionales, que, a menos que se corrijan sustituyendo determinados restos de aminoácido, dan lugar a una pérdida de afinidad de unión.

En una realización, puede determinarse la selección de restos de aminoácido para su retromutación, en parte, mediante modelado computarizado, usando técnicas reconocidas en la materia. En general, se producen modelos moleculares partiendo de estructuras resueltas para cadenas de inmunoglobulina o dominios de las mismas. Las cadenas que se vayan a modelar se comparan respecto de su similitud de secuencias de aminoácidos con cadenas o dominios de estructuras tridimensionales resueltas y se seleccionan como puntos de partida del modelo molecular las cadenas o dominios que muestran una mayor similitud de secuencia. Las cadenas o dominios que muestran al menos un 50% de identidad de secuencia se seleccionan para su modelado y preferentemente, se seleccionan para su modelado aquellas que comparten al menos un 60%, 70%, 80% o 90% de identidad de secuencia. Las

estructuras de partida resueltas se modifican para permitir diferencias entre los aminoácidos reales en las cadenas o dominios de inmunoglobulina que se estén modelando y aquellos en la estructura de partida. Después, se ensamblan las estructuras modificadas en una inmunoglobulina compuesta. Finalmente, se refina el modelo mediante minimización de energía y verificando que todos los átomos se encuentran a distancias adecuadas entre sí y que las distancias y los ángulos de enlace se encuentran dentro de límites químicamente aceptables.

También puede determinarse la selección de restos de aminoácidos para su sustitución, en parte, mediante el examen de las características de los aminoácidos en ubicaciones concretas o mediante la observación empírica de los efectos de la sustitución o la mutagénesis de aminoácidos particulares. Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un resto de marco de región variable murina y un resto de marco de región variable humana seleccionada, puede sustituirse el aminoácido del marco humano por el aminoácido del marco equivalente de la molécula de unión de ratón, cuando se espera razonablemente que el aminoácido: (1) se une de manera no covalente al antígeno de manera directa, (2) es adyacente a una región CDR, (3) interactúa de otro modo con una región CDR (por ejemplo, se encuentra a 3-6 Å de una región CDR, según se determina mediante modelado computarizado) o (4) participa en la interfaz VL-VH.

Los restos que "se unen directamente al antígeno de manera no covalente" incluyen aminoácidos en posiciones en las regiones marco que tienen una buena probabilidad de interactuar directamente con aminoácidos en el antígeno, de acuerdo con fuerzas químicas establecidas, por ejemplo, por puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas y similares.

Los restos que están "adyacentes a una región CDR" incluyen restos de aminoácidos en posiciones inmediatamente adyacentes a una o más de las CDR en la secuencia primaria de la cadena de inmunoglobulina humanizada, por ejemplo, en posiciones inmediatamente adyacentes a una CDR, tal como se define por Kabat o una CDR tal como se define por Chothia (véase, por ejemplo, Chothia y Lesk JMB 196:901 (1987)). Estos aminoácidos tienen particularmente probabilidades de interactuar con los aminoácidos en las CDR y, si se seleccionan del aceptor, pueden distorsionar las CDR donantes y reducir la afinidad. Además, los aminoácidos adyacentes pueden interactuar directamente con el antígeno (Amit et al., Science, 233:747 (1986)) y puede ser deseable la selección de estos aminoácidos del donante para conservar todos los contactos con el antígeno que proporcionan afinidad en la molécula de unión original.

Los restos que "interactúan de otro modo con una región CDR" incluyen aquellos en los que se determinan mediante un análisis estructural secundario que se encuentran en una orientación espacial suficiente para afectar a una región CDR. En una realización, los restos que "por lo demás interactúan con una región CDR" se identifican analizando un modelo tridimensional de la inmunoglobulina donante (por ejemplo, un modelo generado por ordenador). Un modelo tridimensional, típicamente de la molécula de unión donante original, muestra que determinados aminoácidos fuera de las CDR están próximos a las CDR y tienen grandes probabilidades de interactuar con aminoácidos en las CDR mediante puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas, etc. En estas posiciones de aminoácidos, puede seleccionarse el aminoácido de la inmunoglobulina donante en lugar del aminoácido de la inmunoglobulina aceptora. Los aminoácidos de acuerdo con este criterio tendrán generalmente un átomo de cadena lateral a aproximadamente 3Å de algún átomo en las CDR y ha de contener un átomo que podría interactuar con los átomos de la CDR según fuerzas químicas establecidas, tales como aquellas listadas anteriormente.

En el caso de los átomos que pueden formar un enlace de hidrógeno, los 3 Å se miden entre sus núcleos, pero para los átomos que no forman un enlace, los 3 Å se miden entre sus superficies de Van der Waals. De este modo, en el último caso, los núcleos deben encontrarse a aproximadamente 6 Å (3 Å más la suma de los radios de Van der Waals) para los átomos que se considerarán capaces de interactuar. En muchos casos, los núcleos estarán separados unos 4 o 5 a 6 Å. Al determinar si un aminoácido puede interactuar con las CDR, se prefiere no tomar en consideración los 8 últimos aminoácidos de la CDR de cadena pesada como parte de las CDR, ya que, desde el punto de vista estructural, estos 8 aminoácidos se comportan más como parte del marco.

Los aminoácidos que son capaces de interactuar con aminoácidos en las CDR pueden identificarse de otro modo más. El área específica accesible al disolvente de cada aminoácido del marco se calcula de dos modos: (1) en la molécula de unión intacta y (2) en una molécula hipotética que consiste en la molécula de unión con sus CDR eliminadas. Una diferencia significativa entre estos números de aproximadamente 10 Angstroms cuadrados o más muestra que el acceso del aminoácido del marco al disolvente está al menos parcialmente bloqueado por las CDR y, por lo tanto, que el aminoácido entra en contacto con las CDR. El área específica accesible al disolvente de un aminoácido puede calcularse basándose en un modelo tridimensional de una molécula de unión, usando algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Connolly, J. Appl. Cryst. 16:548 (1983) y Lee y Richards, J. Mol. Biol. 55:379 (1971)). Los aminoácidos del marco también pueden interactuar ocasionalmente de manera directa con las CDR, afectando a la conformación de otro aminoácido del marco que, a su vez, entra en contacto con las CDR.

Se sabe que los aminoácidos en varias posiciones en el marco son capaces de interactuar con las CDR en muchas moléculas de unión (Chothia y Lesk, anteriormente citado, Chothia *et al.*, anteriormente citado y Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215:175 (1990)). De manera destacable, se sabe que los aminoácidos en las posiciones 2, 48, 64 y 71 de

la cadena pesada y 26-30, 71 y 94 de la cadena pesada (numeración de acuerdo con Kabat) son capaces de interactuar con las CDR en muchas moléculas de unión. También es probable que los aminoácidos en las posiciones 35 en la cadena ligera y 93 y 103 en la cadena pesada interactúen con las CDR. En todas estas posiciones numeradas, se prefiere la selección del aminoácido donante en lugar del aminoácido aceptor (cuando difieren) para que se encuentre en la inmunoglobulina humanizada. Por otra parte, en ocasiones pueden seleccionarse algunos restos capaces de interactuar con la región CDR, tal como los primeros 5 aminoácidos de la cadena ligera, de la inmunoglobulina aceptora sin pérdida de afinidad en la molécula de unión humanizada.

Los restos que "participan en la interfaz VL-VH" o los "restos empaquetadores" incluyen aquellos restos en la interfaz entre VL y VH, tal como se definen, por ejemplo, por Novotny y Haber (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66 (1985)) o Chothia *et al.*, anteriormente citado. En general, deben conservarse los restos de empaquetados infrecuentes en la molécula de unión humanizada en caso de que difieran de aquellos en los marcos humanos.

En general, se sustituyen uno o más de los aminoácidos que satisfagan los criterios anteriores. En algunas realizaciones, se sustituyen todos o la mayoría de los aminoácidos que satisfacen los criterios anteriores. Ocasionalmente, existe cierto grado de ambigüedad acerca de si un aminoácido concreto satisface los criterios anteriores y se producen moléculas de unión variantes alternativas, una de las cuales tiene esa sustitución particular, y la otra no. Pueden probarse en cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento moléculas de unión variantes alternativas producidas de este modo respecto de la actividad deseada y se selecciona la molécula de unión preferida.

Normalmente, las regiones CDR en las moléculas de unión humanizadas son sustancialmente idénticas y más normalmente, son idénticas a las regiones CDR correspondientes de la molécula de unión donante. Aunque normalmente no es deseable, a veces es posible efectuar una o más sustituciones de aminoácidos conservativas de restos de CDR sin afectar de manera apreciable a la afinidad de unión de la molécula de unión humanizada resultante. Por sustitución conservativa se entienden combinaciones tales como Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr.

Los candidatos adicionales para su sustitución son aminoácidos de marco aceptor humanos que son infrecuentes o "raros" para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden sustituirse por aminoácidos de la posición equivalente de la molécula de unión donante de ratón o de las posiciones equivalentes de inmunoglobulinas humanas más típicas. Por ejemplo, puede ser deseable la sustitución cuando el aminoácido en una región marco humana de la inmunoglobulina aceptora es raro para esa posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante es común para esa posición en las secuencias de inmunoglobulina humanas; o cuando el aminoácido en la inmunoglobulina aceptora es raro para esa posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante también es raro, en relación con otras secuencias humanas. Estos criterios ayudan a asegurarse de que un aminoácido atípico en el marco humano no altera la estructura de la molécula de unión. Además, al reemplazar un aminoácido aceptor humano infrecuente con un aminoácido de la molécula de unión donante que resulta ser típico para moléculas de unión humanas, puede hacerse menos inmunogénica la molécula de unión humanizada.

El término "raro", tal como se usa en el presente documento, indica un aminoácido que aparece en esa posición en menos de aproximadamente un 20%, pero normalmente menos de aproximadamente un 10% de las secuencias en una muestra de secuencias representativa y el término "común", tal como se usa en el presente documento, indica un aminoácido que aparece en más de aproximadamente un 25% pero normalmente más de aproximadamente un 50% de las secuencias en una muestra representativa. Por ejemplo, todas las secuencias de región variable de cadena ligera y pesada humana se agrupan respectivamente en "subgrupos" de secuencias que son especialmente homólogos entre sí y tienen los mismos aminoácidos en determinadas posiciones críticas (Kabat *et al.*, anteriormente citado). Cuando se decide si un aminoácido en una secuencia aceptora humana es "raro" o "común" entre las secuencias humanas, normalmente será preferible tener en consideración solo aquellas secuencias humanas en el mismo subgrupo que la secuencia aceptora.

Los candidatos adicionales para la sustitución son aminoácidos de marco humano aceptores que podrían identificarse como parte de una región CDR según la definición alternativa propuesta por Chothia *et al.*, anteriormente citado. Los candidatos adicionales para la sustitución son aminoácidos de marco humano aceptores que podrían identificarse como parte de una región CDR según las definiciones de AbM y/o de contacto. De manera destacable, se define que la CDR1 en la cadena pesada variable incluye los restos 26-32.

Los candidatos adicionales para su sustitución son restos de marco aceptores que corresponden con un resto de marco donante raro o infrecuente. Los restos de marco raros o infrecuentes son aquellos que son raros o infrecuentes (como se ha definido en el presente documento) para las moléculas de unión murinas en esa posición. Para las moléculas de unión murinas, el subgrupo puede determinarse de acuerdo con Kabat y las posiciones de esto identificadas que difieren de las de consenso. Estas diferencias específicas de donante pueden indicar mutaciones somáticas en la secuencia murina que potencian la actividad. Los restos infrecuentes que se predice que afectan a la unión se conservan, mientras que los restos que se predice que no son importantes para la unión

pueden sustituirse.

Los candidatos adicionales para su sustitución son restos no de línea germinal que se encuentran en una región marco aceptora. Por ejemplo, cuando se alinea una cadena de molécula de unión aceptora (es decir, una cadena de molécula de unión humana que comparte una identidad de secuencia significativa con la cadena de molécula de unión donante) con una cadena de molécula de unión de línea germinal (que igualmente comparte una identidad de secuencia significativa con la cadena donante), los restos que no coincidan entre el marco de la cadena aceptora y el marco de la cadena de línea germinal pueden sustituirse por los restos correspondientes de la secuencia de línea germinal.

Aparte de las sustituciones de aminoácidos específicas descritas anteriormente, las regiones marco de las moléculas de unión humanizadas son normalmente idénticas y más normalmente, son idénticas a las regiones marco de las moléculas de unión humanas de las que proceden. Obviamente, muchos de los aminoácidos en la región marco tienen una contribución escasa o no directa a la especificidad o afinidad de una molécula de unión. Por lo tanto, pueden tolerarse muchas sustituciones conservativas individuales de restos del marco sin un cambio apreciable en la especificidad o afinidad de la molécula de unión humanizada resultante. Por lo tanto, en una realización, la región marco variable de la molécula de unión humanizada comparte al menos un 85% de identidad de secuencia respecto de una secuencia de región marco variable humana o un consenso de dichas secuencias. En otra realización, la región marco variable de la molécula de unión humanizada comparte al menos un 90%, preferentemente un 95%, más preferentemente un 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia respecto de una secuencia de región marco variable o un consenso de dichas secuencias. En general, sin embargo, no son deseables dichas sustituciones.

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende además al menos una retromutación de un resto de aminoácido humano al resto de aminoácido de ratón correspondiente, donde el resto de aminoácido es un resto de empaquetado de la interfaz. Los "restos de empaquetado de la interfaz" incluyen aquellos restos en la interfaz entre VL y VH, tal como se define, por ejemplo, por Novotny y Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66 (1985).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende además al menos una retromutación de un resto de aminoácido humano al resto de aminoácido de ratón correspondiente que es un resto canónico. Los "restos canónicos" son restos marco conservados dentro de una clase canónica o estructural que se sabe que es importante para la conformación de las CDR (Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215:175 (1990)). Los restos canónicos incluyen 2, 25, 27B, 28, 29, 30, 33, 48, 51, 52, 64, 71, 90, 94 y 95 de la cadena ligera y los restos 24, 26, 27, 29, 34, 54, 55, 71 y 94 de la cadena pesada. Pueden identificarse restos adicionales (por ejemplo, restos determinantes de la estructura de CDR) mediante la metodología de Martin y Thorton (1996) J. Mol. Biol. 263:800.

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende además al menos una retromutación de un resto de aminoácido humano al resto de aminoácido de ratón correspondiente, donde el resto de aminoácido se encuentra en una posición capaz de interactuar con una CDR. De manera destacable, se sabe que los aminoácidos en las posiciones 2, 48, 64 y 71 de la cadena pesada y 26-30, 71 y 94 de la cadena pesada (numeración de acuerdo con Kabat) son capaces de interactuar con las CDR en muchos anticuerpos. También es probable que los aminoácidos en las posiciones 35 en la cadena ligera y 93 y 103 en la cadena pesada interactúen con las CDR.

Basándose en un análisis CLUSTAL W, se identificaron varios aminoácidos en el marco humano para su potencial sustitución, por ejemplo, con restos de aminoácido correspondientes de la cadena ligera de 6C8. Estos incluyeron las posiciones 1, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 43, 45, 46, 58, 60, 63, 70, 76, 77, 78, 79, 83, 85, 87, 100 y 104.

En una realización, un marco de cadena ligera variable de una molécula de unión de la invención comprende además al menos una sustitución de un resto de aminoácido al resto de aminoácido de ratón correspondiente seleccionado entre el grupo que consiste en: E1D (es decir, la E en la posición 1 del anticuerpo con las CDR injertadas que comprende CDR murinas y regiones FR humanas está mutado a D, que es el resto de aminoácido correspondiente en el anticuerpo 6C8), P8Q, A9K, T10F, L11M, V13T, P15V, E17D, A19V, T20S, L21V, S22T, A43S, R45K, L46A, I58V, A60D, S63T, E70D, S76N, S77N, L78V, Q79H, F83L, V85E, Y87F, G100A y V104L.

Basándose en un análisis CLUSTAL W, se identificaron varios aminoácidos en el marco humano para su potencial sustitución, por ejemplo, con restos de aminoácido correspondientes de la cadena pesada de 6C8. Estos incluyeron las posiciones 5, 10, 11, 12, 15, 19, 23, 43, 46, 68, 77, 81, 83, 84, 86, 87, 89, 90 y 92.

En una realización, un marco de cadena pesada variable de una molécula de unión de la invención comprende además al menos una sustitución de un resto de aminoácido al resto de aminoácido de ratón correspondiente seleccionado entre el grupo que consiste en: R5K (es decir, la R en la posición 5 del anticuerpo con las CDR injertadas que comprende CDR murinas y regiones FR humanas está mutado a K, que es el resto de aminoácido

correspondiente en el anticuerpo 6C8), A10G, L11I, V12L, T15S, T19S, T23S, P43S, A46G, R68Q, K77R, V81F, T83K, M84I, N86S, M87V, P89T, V90A y T92A.

Las moléculas de unión humanizadas muestran preferentemente una afinidad de unión específica por el antígeno de al menos 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} M⁻¹. Normalmente, el límite superior de la afinidad de unión de las moléculas de unión humanizadas por el antígeno se encuentra dentro de un factor de tres, cuatro o cinco respecto del de la inmunoglobulina donante. Normalmente, el límite inferior de la afinidad de unión también se encuentra dentro de un factor de tres, cuatro o cinco respecto del de inmunoglobulina donante. Como alternativa, la afinidad de unión puede compararse con la de una molécula de unión humanizada que no tiene sustituciones (por ejemplo, una molécula de unión que tiene CDR donantes y FR aceptoras, pero no sustituciones en FR). En dichos casos, la unión de la molécula de unión optimizada (con sustituciones) es preferentemente de dos a tres veces mayor o de tres a cuatro veces mayor, que la de la molécula de unión sin sustituir. Para hacer comparaciones, puede determinarse la actividad de las diversas moléculas de unión, por ejemplo, mediante BIACORE (es decir, resonancia de plasmón superficial usando reactivos no marcados) o ensayos de unión competitiva.

Al haber seleccionado conceptualmente los componentes de la CDR y del marco de las moléculas de unión humanizadas, hay una variedad de métodos disponibles para producir dichas moléculas de unión. Debido a la degeneración del código, una variedad de secuencias de ácido nucleico codificará cada secuencia de aminoácido de la molécula de unión. Las secuencias de ácido nucleico deseadas pueden producirse mediante síntesis de ADN en fase sólida *de novo* o mediante mutagénesis por la PCR de una variante previamente preparada del polinucleótido deseado.

La mutagénesis mediada por oligonucleótidos es un método preferido para preparar variantes de sustitución, eliminación e inserción del ADN del polipéptido diana. Véase Adelman *et al.* (DNA 2:183 (1983)). Brevemente, el ADN del polipéptido diana se altera hibridando un oligonucleótido que codifica la mutación deseada para un molde de ADN monocatenario. Tras la hibridación, se usa una ADN polimerasa para sintetizar una segunda hebra complementaria completa del molde que incorpora el cebador oligonucleotídico y que codifica la alteración seleccionada en el ADN del polipéptido diana.

Los segmentos variables de las moléculas de unión como se han descrito anteriormente (por ejemplo, las regiones variables de cadena pesada y ligera de las moléculas de unión quiméricas, humanizadas o humanas) se unen normalmente a al menos una porción de una región constante (Fc) de una inmunoglobulina, típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Pueden aislarse secuencias de ADN de región constante humana de acuerdo con procedimientos bien conocido a partir de una variedad de células humanas, pero preferentemente linfocitos B inmortalizados (véase Kabat *et al.*, anteriormente citado y Liu *et al.*, documento WO87/02671). Generalmente, la molécula de unión contendrá regiones constantes tanto de cadena ligera como de cadena pesada. La región constante de cadena pesada incluye normalmente las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4. Una molécula de unión descrita en el presente documento incluye anticuerpos que tienen todos los tipos de regiones constantes, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La elección de la región constante depende, en parte, de si se desea toxicidad mediada por complemento y/o celular de la molécula de unión. Por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad de complemento y los isotipos IgG2 e IgG4 no. Cuando se desee que la molécula de unión (por ejemplo, molécula de unión humanizada) muestre una actividad citotóxica, el dominio constante es normalmente un dominio constante de fijación a complemento y la clase es normalmente IgG1. Cuando no es deseable dicha actividad citotóxica, el dominio constante puede ser, por ejemplo, de la clase IgG2. La elección del isotipo también puede afectar al paso del anticuerpo al cerebro. Se prefiere el isotipo IgG1 humano. Las regiones constantes ligeras pueden ser lambda o kappa. La molécula de unión humanizada puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo. Las moléculas de unión pueden expresarse en forma de tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos pesadas, en forma de cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, en forma de Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv o en forma de moléculas de unión monocatenarias en las que los dominios variables de cadena ligera están unidos a través de un espaciador.

III. Producción de moléculas de unión

La presente invención presenta moléculas de unión que tienen especificidad por GITR, por ejemplo, GITR humana. Dichas moléculas de unión pueden usarse para formular diversas composiciones terapéuticas de la invención o, preferentemente, proporcionan regiones determinantes de la complementariedad para la producción de moléculas de unión humanizadas o quiméricas (descritas en detalle más adelante). La producción de moléculas de unión monoclonales no humanas, por ejemplo, murinas, de cobaya, de primate, de conejo o de rata puede lograrse, por ejemplo, inmunizando al animal con GITR o con una molécula de ácido nucleico que codifica GITR. Por ejemplo, la molécula de unión 6C8 se preparó colocando el gen que codifica GITR humana en un vector de expresión e inmunizando a los animales. También puede usarse un polipéptido más largo que comprende GITR o un fragmento inmunogénico de GITR o una molécula de unión anti-idiotípica de GITR (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, anteriormente citado). Dicho inmunógeno puede obtenerse de una fuente natural, mediante síntesis peptídica o mediante expresión recombinante. Opcionalmente, el inmunógeno puede administrarse, fusionarse o de otro modo complejarse con una proteína transportadora, como se describe más adelante. Opcionalmente, el inmunógeno

puede administrarse con un adyuvante. El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que, cuando se administra conjuntamente con un antígeno, aumenta la respuesta inmunitaria contra el antígeno, pero cuando se administra solo no genera una respuesta inmunitaria contra el antígeno. Los adyuvantes pueden aumentar una respuesta inmunitaria por medio de varios mecanismos, incluyendo el reclutamiento de linfocitos, la estimulación de linfocitos B y/o T y la estimulación de macrófagos. Pueden usarse varios tipos de adyuvantes como se describe más adelante. Se prefiere el uso de adyuvante completo de Freund seguido de adyuvante incompleto para la inmunización de animales de laboratorio.

Normalmente, se usan conejos o cobayas para producir moléculas de unión policlonales. La preparación de moléculas de unión policlonales, por ejemplo, para una protección pasiva, puede efectuarse del siguiente modo. Se inmuniza a los animales con 100 µg de GTR, más adyuvante y se les sacrifica a los 4-5 meses. Se recoge su sangre y se separan las IgG de otros componentes sanguíneos. Las moléculas de unión específicas para el inmunógeno pueden purificarse parcialmente mediante cromatografía de afinidad. Se obtiene de cada animal una media de aproximadamente 0,5-1,0 mg de molécula de unión específica de inmunógeno, proporcionando un total de 60-120 mg.

Normalmente, se usan ratones para producir moléculas de unión monoclonales. Las moléculas monoclonales pueden prepararse contra un fragmento inyectando el fragmento o una forma de mayor tamaño de GTR en un ratón, preparando hibridomas y explorando los hibridomas respecto de una molécula de unión que se une específicamente a GTR. Opcionalmente, las moléculas de unión se exploran respecto de su unión a una región específica o un fragmento deseado de GTR sin unirse a otros fragmentos no solapantes de GTR. Esta última exploración puede lograrse determinando la unión de una molécula de unión a una colección de mutantes de eliminación de un péptido GTR y determinado qué mutantes de eliminación se unen a la molécula de unión. La unión puede evaluarse, por ejemplo, mediante transferencias de Western o ELISA. El fragmento más pequeño para mostrar unión específica por la molécula de unión define el epítipo de la molécula de unión. Como alternativa, puede determinarse la especificidad de epítipo mediante un ensayo de competición en el que una molécula de unión de ensayo y una de referencia compiten por la unión a GTR. En caso de que la molécula de ensayo y la de referencia compitan, estas se unen al mismo epítipo (o epítipos suficientemente próximos) de tal forma que la unión de una molécula de unión interfiere con la unión de la otra. El isotipo preferido de dichas moléculas de unión es el isotipo IgG2a de ratón o un isotipo equivalente en otras especies. El isotipo IgG2a de ratón es el equivalente al isotipo IgG1 humano.

En otra realización, puede aislarse fácilmente el ADN que codifica una molécula de unión usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de las moléculas de unión murinas). Las células de hibridoma aisladas y subclonadas sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras procariontas o eucariotas, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen inmunoglobulinas. Más particularmente, el ADN aislado (que puede ser sintético, tal como se describe en el presente documento) puede usarse para clonar secuencias de regiones constantes y variables de las moléculas de unión, tal como se describen en Newman et al., Patente de los Estados Unidos n.º 5.658.570, presentada el 25 de enero de 1995. Esencialmente, esto implica la extracción de ARN de las células seleccionadas, la conversión en ADNc y la amplificación mediante PCR usando cebadores específicos de Ig. También se describen cebadores adecuados para este fin en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.658.570. Las células transformadas que expresan el anticuerpo deseado pueden producirse en cantidades relativamente elevadas para proporcionar un suministro clínico y comercial de la molécula de unión.

Los expertos en la materia también apreciarán que el ADN que codifica las moléculas de unión o los fragmentos de las mismas (por ejemplo, sitios de unión a antígeno) también puede proceder de fagotecas de anticuerpos, por ejemplo, usando la tecnología de *phage display* o de *phage display*. Los métodos ejemplares se exponen, por ejemplo, en el documento EP 368 684 B1; la Patente de los Estados Unidos 5.969.108, Hoogenboom, H.R. y Chames. 2000. *Immunol. Today* 21:371; Nagy et al. 2002. *Nat. Med.* 8:801; Huie et al. 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:2682; Lui et al. 2002. *J. Mol. Biol.* 315:1063. Varias publicaciones (por ejemplo, Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)) han descrito la producción de moléculas de unión humanas de alta afinidad mediante reordenamiento de cadenas, así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir grandes fagotecas. En otra realización, puede usarse presentación en ribosomas para reemplazar a los bacteriófagos como plataforma de presentación (véase, por ejemplo, Hanes et al. 2000. *Nat. Biotechnol.* 18:1287; Wilson et al. 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3750; o Irving et al. 2001 *J. Immunol. Methods* 248:31. En otra realización más, las bibliotecas de la superficie celular pueden explorarse respecto de moléculas de unión (Boder et al. 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10701; Daugherty et al. 2000 *J. Immunol. Methods* 243:211). Dichos procedimientos proporcionan alternativas a las técnicas de hibridoma convencionales para el aislamiento y posterior clonación de moléculas de unión monoclonales.

Otras realizaciones más de la presente invención comprenden la generación de moléculas de unión humanas o sustancialmente humanas en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son incapaces de producir inmunoglobulinas endógenas (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.075.181, 5.939.598,

5.591.669 y 5.589.369). Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica de la región de unión de cadena pesada de anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal da como resultado una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de un conjunto de genes de inmunoglobulina humanos a dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de moléculas de unión tras la exposición a antígenos. Otro medio preferido para generar moléculas de unión humanas usando ratones SCID se divulga en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.811.524. Se apreciará que el material genético asociado con estas moléculas de unión humanas también puede aislarse y manipularse como se describe en el presente documento.

Otro medio altamente eficaz para generar moléculas de unión recombinante se divulga por Newman, *Biotechnology*, 10: 1455-1460 (1992). Específicamente, esta técnica da como resultado la generación de moléculas de unión primatizadas que contienen dominios variables de mono y secuencias constantes humanas. Además, esta técnica también se describe en las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.658.570, 5.693.780 y 5.756.096.

En otra realización, los linfocitos pueden seleccionarse mediante micromanipulación y aislarse los genes variables. Por ejemplo, pueden aislarse células mononucleares de sangre periférica de un mamífero inmunizado y cultivarse durante aproximadamente 7 días *in vitro*. Los cultivos pueden explorarse respecto de IgG específicas que satisfacen los criterios de exploración. Las células de los pocillos positivos pueden aislarse. Los linfocitos B productores de Ig pueden aislarse mediante FACS o identificándolos en un ensayo de placa hemolítica mediada por complemento. Los linfocitos B productores de Ig pueden micromanipularse en un tubo y pueden amplificarse los genes de VH y VL usando, por ejemplo, RT-PCR. Los genes de VH y VL pueden clonarse en un vector de expresión de anticuerpo y transfectarse en células (por ejemplo, células eucariotas o procariotas) para su expresión.

Además, las secuencias genéticas útiles para producir los polipéptidos de la presente invención pueden obtenerse a partir de una serie de diferentes fuentes. Por ejemplo, como se ha tratado exhaustivamente anteriormente, se encuentra disponible una serie de genes de anticuerpo humanos en forma de depósitos públicamente disponibles. Se han publicado muchas secuencias de anticuerpo y de genes codificantes de anticuerpo y los genes de anticuerpo adecuados pueden sintetizarse químicamente a partir de estas secuencias usando técnicas reconocidas en la materia. Las técnicas de síntesis de oligonucleótidos compatibles con este aspecto de la invención se conocen bien por los expertos en la materia y pueden llevarse a cabo usando cualquiera de varios sintetizadores automatizados disponibles comercialmente. Además, las secuencias de ADN que codifican varios tipos de cadenas pesadas y ligeras expuestas en el presente documento pueden obtenerse de proveedores de síntesis de ADN comerciales. El material genético obtenido usando cualquiera de los métodos anteriores puede alterarse o sintetizarse para obtener polipéptidos de la presente invención.

Como alternativa, pueden seleccionarse líneas celulares productoras de anticuerpo y cultivarse usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Dichas técnicas se describen en una serie de manuales de laboratorio y de publicaciones primarias. A este respecto, las técnicas adecuadas para su uso en la invención como se han descrito anteriormente se describen en *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates y Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, Nueva York (1991).

Como es bien sabido, el ARN puede aislarse de las células de hibridoma originales o de otras células transformadas mediante técnicas convencionales, tales como extracción con isotiocianato de guanidinio y precipitación seguida de centrifugado o cromatografía. Cuando sea deseable, el ARNm puede aislarse del ARN total mediante técnicas convencionales, tales como cromatografía en oligo dT celulosa. Las técnicas adecuadas son familiares en la materia.

En una realización, los ADNc que codifican las cadenas pesada y ligera de la molécula de unión pueden producirse, ya sea de manera simultánea o por separado, usando retrotranscriptasa y ADN polimerasa, de acuerdo con métodos bien conocidos. La PCR puede iniciarse mediante cebadores de región constante consenso o mediante cebadores más específicos basados en las secuencias de ADN y de aminoácidos de cadena pesada y ligera publicadas. Tal como se ha descrito anteriormente, la PCR también puede usarse para aislar clones de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de la molécula de unión. En este caso, pueden explorarse las bibliotecas mediante cebadores consenso o sondas homólogas mayores, tales como sondas de región constante de ratón.

El ADN, típicamente ADN plasmídico, puede aislarse de las células usando técnicas conocidas en la materia, mapearse por restricción y secuenciarse de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas expuestas en detalle, por ejemplo, en las referencias anteriores relativas a las técnicas de ADN recombinante. Obviamente, el ADN puede ser sintético de acuerdo con la presente invención en cualquier punto durante el proceso de aislamiento o el análisis posterior.

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende o consiste en un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo. La expresión "fragmento de unión a antígeno" se refiere a un fragmento de polipéptido de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une al antígeno o compite con el anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que proceden) por la unión al antígeno (es decir, unión específica). Tal como se usa en el presente documento, el término "fragmento" de una molécula de anticuerpo incluye fragmentos de unión a antígeno

de anticuerpos, por ejemplo, una cadena ligera de anticuerpo (VL), una cadena pesada de anticuerpo (VH), un anticuerpo monocatenario (scFv), un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab, un fragmento Fd, un fragmento Fv y un fragmento de anticuerpo de un solo dominio (DAb). Los fragmentos pueden obtenerse, por ejemplo, mediante tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo intacto o completo o una cadena de anticuerpo o por medios recombinantes.

5
10
15
En una realización, una molécula de unión de la invención es un anticuerpo diseñado por ingeniería genética o modificado. Las formas diseñadas por ingeniería genética de los anticuerpos incluyen, por ejemplo, minibodies, diabodies, diabodies fusionados a moléculas CH₃, anticuerpos tetravalentes, intradiabodies (por ejemplo, Jendreyko et al. 2003. *J. Biol. Chem.* 278:47813) anticuerpos biespecíficos, proteínas de fusión (por ejemplo, proteínas de fusión de anticuerpo-citocina) o anticuerpos biespecíficos. Otras inmunoglobulinas (Ig) y determinadas variantes de las mismas se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos n.º 4.745.055; el documento EP 256.654; Faulkner et al., *Nature* 298:286 (1982); el documento EP 120.694; el documento EP 125.023; Morrison, *J. Immunol.* 123:793 (1979); Kohler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197 (1980); Raso et al., *Cancer Res.* 41:2073 (1981); Morrison et al., *Ann. Rev. Immunol.* 2:239 (1984); Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851 (1984); el documento EP 255.694; el documento EP 266.663; y el documento WO 88/03559. También se conocen las cadenas de inmunoglobulina reorganizadas. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 4.444.878; el documento WO 88/03565; y el documento EP 68.763 y las referencias citadas en los mismos.

20
En una realización, los anticuerpos modificados de la invención son minibodies. Los minibodies son moléculas diméricas formadas por dos cadenas de polipéptido que comprenden cada una, una molécula de scFv (un polipéptido individual que comprende uno o más sitios de unión a antígeno, por ejemplo, un dominio VL unido mediante un enlazador flexible a un dominio VH fusionado a un dominio CH₃ a través de un péptido conector).

Las moléculas de scFv pueden construirse en una orientación VH-enlazador-VL o una orientación VL-enlazador-VH.

25
La bisagra flexible que enlaza los dominios VL y VH que forman el sitio de unión a antígeno comprende preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 restos de aminoácidos. Un péptido conector ejemplar para este fin es (Gly₄Ser)₃ (SEQ ID NO: 17) (Huston et al. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879). Se conocen en la técnica otros péptidos conectores.

30
Se conocen bien en la técnica métodos para producir anticuerpos monocatenarios, por ejemplo, Ho et al. 1989. *Gene* 77:51; Bird et al. 1988 *Science* 242:423; Pantoliano et al. 1991. *Biochemistry* 30:10117; Milenic et al. 1991. *Cancer Research* 51:6363; Takkinen et al. 1991. *Protein Engineering* 4:837.

35
Los minibodies puede producirse construyendo un componente scFv y conectando el componente péptido-CH₃ usando métodos descritos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 5.837.821 o el documento WO 94/09817A1). Estos componentes pueden aislarse a partir de plásmidos separados en forma de fragmentos de restricción y después se ligan y vuelven a clonar en un vector adecuado. Puede verificarse el ensamblaje adecuado mediante digestión de restricción y análisis de la secuencia de ADN.

40
Los diabodies son similares a las moléculas scFv, pero normalmente tienen un enlazador de restos de aminoácidos corto (de menos de 10 y preferentemente de 1-5) que conectan ambos dominios V, de tal forma que no pueden interactuar los dominios VL y VH en la misma cadena de polipéptido. En su lugar, el dominio VL y VH de una cadena de polipéptido interactúa con el dominio VH y VL (respectivamente) de una segunda cadena de polipéptido (documento WO 02/02781). En una realización, una molécula de unión de la invención es un diabody fusionado a al menos una porción de cadena pesada. En una realización preferida, una molécula de unión de la invención es un diabody fusionado a un dominio CH₃.

45
También se encuentran dentro del alcance de la presente invención otras formas de anticuerpos modificados (por ejemplo, los documentos WO 02/02781 A1; 5.959.083; 6.476.198 B1; US 2002/0103345 A1; WO 00/06605; Byrn et al. 1990. *Nature*. 344:667-70; Chamow y Ashkenazi. 1996. *Trends Biotechnol.* 14:52).

50
55
En una realización, una molécula de unión de la invención comprende una región constante de inmunoglobulina. Se sabe en la técnica que la región constante media varias funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a moléculas de unión activa el sistema de complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y la lisis de patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar implicada en la hipersensibilidad autoinmunitaria. Además, las moléculas de unión se unen a las células a través de la región Fc, uniéndose un sitio de receptor de Fc en la región Fc de la molécula de unión a un receptor de Fc (FcR) en una célula. Existe una serie de receptores de Fc que son específicos para diferentes clases de moléculas de unión, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores epsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión de la molécula de unión a receptores de Fc en las superficies celulares desencadena una serie de respuestas biológicas importantes y diversas, incluyendo el

atrapamiento y la destrucción de las partículas recubiertas de molécula de unión, la eliminación de complejos inmunitarios, la lisis de células diana recubiertas con moléculas de unión por células eliminadoras (denominada citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo o ADCC), la liberación de mediadores inflamatorios, la transferencia placentaria y el control de la producción de inmunoglobulina.

- 5 En una realización, las funciones efectoras pueden eliminarse o reducirse usando una región constante de una molécula de unión IgG4, que se cree que es incapaz de eliminar células diana o de producir variantes de Fc, en donde los restos en la región Fc críticos para las funciones efectoras se mutan usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 5.585.097. Por ejemplo, la eliminación o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión al receptor de Fc de la molécula de unión modificada circulante, aumentando de este modo la localización en el tumor. En otros casos, puede suceder que las modificaciones de la región constante consistentes con la presente invención moderen la unión al complemento y, por lo tanto, reduzcan la semivida en suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Pueden usarse otras modificaciones más de la región constante para modificar enlaces disulfuro o restos de oligosacáridos que permiten una localización mejorada debido a una especificidad antigénica aumentada o a la flexibilidad de la molécula de unión. Más generalmente, los expertos en la materia serán conscientes de que las moléculas de unión modificadas como se describe en el presente documento pueden ejercer una serie de efectos sutiles y pueden apreciarse o no fácilmente. Sin embargo, el perfil fisiológico resultante, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, tales como la localización en tumores, la biodistribución y la semivida en suero, puede medirse y cuantificarse fácilmente usando técnicas inmunológicas bien conocidas sin experimentación innecesaria.

En una realización, puede derivatizarse una molécula de unión de la invención o unirse a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por consiguiente, una molécula de unión de la invención incluye formas derivatizadas o de otro modo modificadas de las moléculas de unión anti-GITR descritas en el presente documento, incluyendo moléculas de inmunoadhesión. Por ejemplo, una molécula de unión de la invención puede estar unida funcionalmente (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otra molécula de unión (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diabody), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación de la molécula de unión con otra molécula (tal como una región de núcleo de estreptavidina o un marcador de polihistidina).

30 Un tipo de molécula de unión derivatizada se produce reticulando dos o más moléculas de unión (del mismo tipo o de tipos diferentes, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Los reticulantes adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos que reaccionan de manera distinta separados por un espaciador adecuado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidrosuccinimida) u homobifuncional (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Dichos enlazadores se encuentran disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

35 Los agentes detectables útiles con los que puede derivatizarse una molécula de unión de la invención incluyen compuestos fluorescentes. Los agentes detectables fluorescentes incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina y similares. Una molécula de unión también puede derivatizarse con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa y similares. Cuando se derivatiza una molécula de unión con una enzima detectable, se detecta añadiendo reactivos adicionales que usa la enzima para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando está presente el agente detectable, peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina genera un producto de reacción coloreado, que es detectable. También puede derivatizarse una molécula de unión con biotina y detectarse mediante la medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina.

IV. Expresión de moléculas de unión

45 Puede prepararse una molécula de unión de la invención mediante expresión recombinante de genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina en una célula hospedadora. Para expresar una molécula de unión de manera recombinante, se transfecta una célula hospedadora con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina de la molécula de unión, de tal forma que se expresan las cadenas pesada y ligera en la célula hospedadora y, preferentemente, se secretan al medio en el que se cultivan las células hospedadoras, pudiéndose recuperar una molécula de unión a partir de dicho medio. Se usan metodologías de ADN recombinante convencionales para obtener genes de cadena pesada y ligera, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinantes e introducir los vectores en células hospedadoras, tales como aquellas descritas en Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Segunda edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F.M. et al. (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989) y en la Patente de los Estados Unidos n.º 4.816.397 de Boss, et al.

Para expresar una molécula de unión de la invención, pueden insertarse los ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas de longitud completa en vectores de expresión, de tal forma que los genes se unen operativamente a

secuencias de control transcripcional y traduccional. En este contexto, la expresión "unido operativamente" significa que se liga un gen de molécula de unión en un vector, de tal forma que las secuencias de control transcripcional y traduccional dentro del vector cumplen con su función prevista de regular la transcripción y traducción del gen de la molécula de unión. En una realización, el vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan para que sean compatibles con la célula hospedadora de expresión empleada. El gen de cadena ligera de la molécula de unión y el gen de la cadena pesada de la molécula de unión pueden insertarse en un vector separado o, más típicamente, se insertan ambos genes en el mismo vector de expresión. Los genes de la molécula de unión pueden insertarse en el vector de expresión mediante métodos convencionales (por ejemplo, ligamiento de sitios de restricción complementarios en el fragmento génico de la molécula de unión y el vector o mediante ligamiento de extremos romos en caso de que no haya sitios de restricción). Antes de la inserción de las secuencias de cadena ligera o pesada de la molécula de unión, el vector de expresión puede ya portar secuencias de región constante de la molécula de unión. Por ejemplo, una estrategia para convertir las secuencias de VH y VL a genes de molécula de unión de longitud completa es insertarlos en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y regiones constantes de cadena ligera, respectivamente, de tal forma que el segmento VH está unido operativamente a los segmentos CH dentro del vector y el segmento VL está unido operativamente al segmento CL dentro del vector. Adicionalmente o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena de la molécula de unión de una célula hospedadora. El gen de la cadena de molécula de unión puede clonarse en el vector, de tal forma que el péptido de señal se une en fase al extremo amino del gen de la cadena de molécula de unión. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína no de inmunoglobulina).

Además de los genes de la cadena de la molécula de unión, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena de molécula de unión en una célula hospedadora. La expresión "secuencia reguladora" incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de la cadena de molécula de unión. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se vaya a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para expresión en células hospedadoras de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/potenciador de CMV), virus de simio 40 (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal (AdMLP)) y polioma. Para una descripción adicional de los elementos reguladores víricos y las secuencias de los mismos, véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.168.062 de Stinski, la Patente los Estados Unidos n.º 4.510.245 de Bell et al. y la Patente de los Estados Unidos n.º 4.968.615 de Schaffner, et al.

Además de los genes de molécula de unión y de las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel et al.). Por ejemplo, el gen marcador de selección confiere típicamente resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, a una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores de selección preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr con selección/amplificación en metotrexato) y el gen neo (para selección en G418).

Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, se transfectan los vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de unión en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" abarquen una gran variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procarionota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Es posible expresar una molécula de unión de la invención en células hospedadoras procarionotas o eucariotas. Se prefiere especialmente la expresión de las moléculas de unión en células eucariotas y lo más preferentemente en células hospedadoras de mamífero, ya que dichas células eucariotas y en particular las células de mamífero tienen mayores probabilidades de ensamblar y secretar una molécula de unión adecuadamente plegada e inmunológicamente activa que las células procarionotas.

Habitualmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección (por ejemplo, resistencia a ampicilina, resistencia a higromicina, resistencia a tetraciclina o resistencia a neomicina) para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, Itakura et al., Patente de los Estados Unidos 4.704.362).

La *E. coli* es un hospedador procariota particularmente útil para clonar los polinucleótidos (por ejemplo, secuencias de ADN) de la presente invención. Otros hospedadores microbianos adecuados para su uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras *Enterobacteriaceae*, tales como *Salmonella*, *Serratia*, y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos hospedadores procariotas, también pueden producirse vectores de expresión, que típicamente contendrán secuencias de control de la expresión compatibles con la célula hospedadora (por ejemplo, un origen de replicación). Además, estará presente cualquier número de una serie de promotores bien conocidos, tales como el sistema de promotor de lactosa, un sistema de promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor de beta-lactamasa o un sistema promotor de fago lambda. Los promotores normalmente controlarán la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora y tienen secuencias de sitio de unión a ribosomas y similares, para iniciar y completar la transcripción y la traducción.

También son útiles para la expresión otros microbios, tales como levaduras. Un hospedador de levadura preferido es *Saccharomyces*, con vectores adecuados que contienen secuencias de control de la expresión (por ejemplo, promotores), un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, según se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato cinasa y otras enzimas glucolíticas. Los promotores inducibles en levaduras incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa.

Además de microorganismos, también pueden usarse cultivos de células de tejidos de mamíferos para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, polinucleótidos que codifican moléculas de unión). Véase Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). De hecho, se prefieren células eucariotas, ya que se ha desarrollado en la técnica una serie de líneas celulares hospedadoras adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas (por ejemplo, moléculas de unión intactas) e incluyen líneas celulares CHO, diversas líneas celulares Cos, células HeLa, líneas celulares de mieloma o linfocitos B transformados o hibridomas. Preferentemente, las células no son humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)) y los sitios de procesamiento de la información necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras transcripcionales. Las secuencias de control de la expresión preferidas son promotores procedentes de genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus y similares. Véase Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

Como alternativa, las secuencias codificantes de la molécula de unión pueden incorporarse en transgenes para su introducción en el genoma de un animal transgénico y su posterior expresión en la leche del animal transgénico (véase, por ejemplo, Deboer et al., documento US 5.741.957, Rosen, documento US 5.304.489 y Meade et al., documento US 5.849.992). Los transgenes adecuados incluyen secuencias codificantes para cadenas ligeras y/o pesadas en unión operativa con un promotor y potenciador de un gen específico de glándula mamaria, tal como caseína o beta lactoglobulina.

Las células hospedadoras de mamífero preferidas para expresar las moléculas de unión recombinantes de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador de selección de DHFR, por ejemplo, como se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células NS0 de mieloma, células COS y células SP2. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de moléculas de unión en células hospedadoras de mamífero, las moléculas de unión se producen cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión de la molécula de unión en las células hospedadoras o, más preferentemente, la secreción de la molécula de unión en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. Las moléculas de unión pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales.

Los vectores que contienen las secuencias de polinucleótido de interés (por ejemplo, las secuencias que codifican la cadena pesada y ligera de la molécula de unión y las secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula hospedadora mediante métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, normalmente se usa transfección con cloruro de calcio para células procariotas, mientras que, para otros hospedadores, puede usarse tratamiento con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, biolística o transfección a base de virus. (Véase, a título general, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 2ª ed., 1989). Otros métodos usados para transformar células de mamífero incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación y microinyección (véase, a título general, Sambrook et al., anteriormente citado). Para la producción de animales transgénicos, pueden microinyectarse los transgenes en ovocitos fertilizados o pueden incorporarse en el genoma de células madre embrionarias y se transfieren los núcleos de dichas células a ovocitos desnucleados.

Cuando se clonan las cadenas pesadas y ligeras en vectores de expresión separados, se cotransfectan los vectores para obtener la expresión y el ensamblaje de inmunoglobulinas intactas. Una vez expresadas, las moléculas de unión completas, sus dímeros, las cadenas ligeras y pesadas individuales u otras formas de inmunoglobulina de la

presente invención pueden purificarse de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, purificación por HPLC, electroforesis en gel y similares (véase, a título general, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982)). Se prefieren moléculas de unión sustancialmente puras con una homogeneidad de al menos aproximadamente el 90 al 95%, prefiriéndose aún más una homogeneidad del 98 al 99%, para usos farmacéuticos.

Las células hospedadoras también pueden usarse para producir porciones de moléculas de unión intactas, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Ha de entenderse que se encuentran dentro del alcance de la presente invención variaciones de los procedimientos anteriores. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula hospedadora con ADN que codifica la cadena ligera o la cadena pesada (pero no ambas) de una molécula de unión de la presente invención. También puede usarse tecnología de ADN recombinante para eliminar la totalidad o parte del ADN que codifica una cualquiera o ambas de las cadenas ligeras y pesadas que no sean necesarias para la unión a GITR. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncadas también están abarcadas por una molécula de unión de la invención. Además, pueden producirse moléculas de unión bifuncionales en las que una cadena pesada y una ligera forman una molécula de unión de la invención y la otra cadena pesada y ligera son específicas para un antígeno distinto de GITR reticulando una molécula de unión de la invención con una segunda molécula de unión mediante métodos de reticulación química convencionales.

En vista de lo anterior, otro aspecto de la invención se refiere a composiciones de ácido nucleico, vector y células hospedadoras que pueden usarse para la expresión recombinante de una molécula de unión de la invención. La secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera de 6C8 se muestra en la figura 18 y en la SEQ ID NO: 10. El dominio CDR1 de la VL abarca los nucleótidos 130-162 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO: 14), el dominio CDR2 abarca los nucleótidos 208-228 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO: 15) y el dominio CDR3 abarca los nucleótidos 325-351 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO: 16). La secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada de 6C8 se muestra en la figura 18 y en la SEQ ID NO: 9. El dominio CDR1 de la VH abarca los nucleótidos 133-168 de la SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 11), el dominio CDR2 abarca los nucleótidos 211-258 de la SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 12) y el dominio CDR3 abarca los nucleótidos 355-381 de la SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 13). En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la CDR2 de la VH comprende la SEQ ID NO: 12. En otra realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la CDR2 de la VH comprende la SEQ ID NO: 65 (CACATTTGGTGGGATGATGATAAGTACTATCAACCATCCCTGAAGAGC). Los expertos en la materia apreciarán que las secuencias de nucleótidos que codifican moléculas de unión relacionadas con 6C8 pueden proceder de las secuencias de nucleótidos que codifican la VL y la VH de 6C8 usando el código genético y técnicas de biología molecular convencionales.

En una realización, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una secuencia de polipéptido que comprende una CDR de 6C8, por ejemplo, comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8.

En otra realización más, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una región variable de cadena ligera de la molécula de unión que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, aunque los expertos en la materia apreciarán que debido a la degeneración del código genético, otras moléculas de ácido nucleico pueden codificar la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. La molécula de ácido nucleico puede codificar únicamente la VL o también puede codificar una región constante de cadena ligera de la molécula de unión, unida operativamente a la VL. En una realización, esta molécula de ácido nucleico se encuentra en un vector de expresión recombinante.

En otra realización más, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una región variable de cadena pesada de la molécula de unión que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, aunque los expertos en la materia apreciarán que debido a la degeneración del código genético, otras moléculas de ácido nucleico pueden codificar la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En otra realización, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una región variable de cadena pesada de la molécula de unión que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66, aunque los expertos en la materia apreciarán que debido a la degeneración del código genético, otras moléculas de ácido nucleico pueden codificar la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66. La molécula de ácido nucleico puede codificar únicamente la VH o también puede codificar una región constante de cadena pesada, unida operativamente a la VH. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede comprender una región constante de IgG1 o IgG2. En una realización, esta molécula de ácido nucleico se encuentra en un vector de expresión recombinante.

La invención también proporciona vectores de expresión recombinantes que codifican una cadena pesada de la molécula de unión y/o una cadena ligera de la molécula de unión. Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un vector de expresión recombinante que codifica:

- a) una cadena ligera de la molécula de unión que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y

b) una cadena pesada de la molécula de unión que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

En otra realización, la invención proporciona un vector de expresión recombinante que codifica:

- 5 a) una cadena ligera de la molécula de unión que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y
 b) una cadena pesada de la molécula de unión que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66.

10 La invención también proporciona células hospedadoras en las que se han introducido uno o más vectores de expresión recombinantes de la invención. Preferentemente, la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero.

Además, la invención proporciona un método para sintetizar moléculas de unión recombinantes de la invención cultivando una célula hospedadora de la invención en un medio de cultivo adecuado, hasta que se sintetiza una molécula de unión recombinante de la invención. El método puede comprender además aislar la molécula de unión recombinante del medio de cultivo.

15 **V. Usos de las moléculas de unión de la invención**

En otra realización, la divulgación proporciona un método para anular la supresión de los linfocitos T efectores por parte de los linfocitos T reguladores. La anulación de la supresión de los linfocitos T efectores por parte de los linfocitos T reguladores puede evaluarse, por ejemplo, midiendo la capacidad de la molécula de unión para potenciar la función de los linfocitos T efectores en presencia de linfocitos T reguladores, por ejemplo, la producción de citocinas, (por ejemplo, la producción de IL-2) o la proliferación celular (por ejemplo, la proliferación de linfocitos T colaboradores), por ejemplo, midiendo la incorporación de ³H-timidina o mediante análisis FACS. Por ejemplo, la respuesta o la actividad de los linfocitos T efectores será baja en presencia de linfocitos T reguladores, pero aumentará con la adición de una molécula de unión a GITR incluso en presencia de linfocitos T reguladores, es decir, las moléculas de unión a GITR anulan la supresión de los linfocitos T efectores por parte de los linfocitos T reguladores.

Las moléculas de unión de la invención también pueden usarse para atenuar la degradación de I-κB en células. Puede evaluarse la atenuación de la degradación de I-κB en células, por ejemplo, mediante transferencia de Western y cuantificando la cantidad de I-κB después del tratamiento de las células con la molécula de unión anti-GITR.

30 Numerosas enfermedades o patologías podrían beneficiarse de potenciar la actividad de los linfocitos T efectores y/o de la modulación negativa de la actividad de los linfocitos T reguladores, por ejemplo, anulando la supresión de los linfocitos T efectores por parte de los linfocitos T reguladores. Por ejemplo, las células efectoras inmunitarias normalmente no logran reaccionar de manera eficaz con células cancerosas. Por consiguiente, cuando se desea una respuesta de linfocitos T efectores o de anticuerpo potenciada, pueden usarse los métodos de la invención para tratar a un sujeto que padece dicho trastorno. En una realización, dichos métodos comprenden administrar al sujeto una molécula de unión de la invención, de tal forma que se anula la supresión de los linfocitos T efectores por parte de los linfocitos T reguladores, potenciando de este modo una respuesta inmunitaria. Preferentemente, el sujeto es un sujeto humano. Como alternativa, el sujeto puede ser un mamífero que expresa una GITR con la que reacciona de manera cruzada una molécula de unión de la invención. Además, el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido GITR (por ejemplo, mediante la administración de GITR o mediante la expresión de un transgén de GITR). Puede administrarse una molécula de unión de la invención a un sujeto humano con fines terapéuticos o profilácticos. Por ejemplo, puede haberse diagnosticado que el sujeto tiene la enfermedad o el trastorno o que tiene predisposición o es susceptible a la enfermedad. Además, puede administrarse una molécula de unión de la invención a un mamífero no humano que expresa una molécula de GITR con la que reacciona de manera cruzada la molécula de unión (por ejemplo, un primate) con fines veterinarios o como modelo animal de una enfermedad humana. En referencia a esto último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica y/o profiláctica de las moléculas de unión de la invención (por ejemplo, prueba de dosis y/o tiempos de administración).

A continuación, se describen adicionalmente usos ejemplares de las moléculas de unión de la invención:

50 **Composiciones inmunoestimuladoras**

Tal como se describe en los ejemplos adjuntos, las moléculas de unión de la invención pueden usarse como composiciones (o vacunas) inmunoestimuladoras, por ejemplo, en combinación con un antígeno, para promover una respuesta inmunitaria potenciada frente a un antígeno de interés, por ejemplo, un antígeno proteico, en un sujeto. Es

decir, las moléculas de unión de la invención pueden servir como adyuvantes para potenciar respuestas inmunitarias. Por ejemplo, para estimular una respuesta inmunitaria de anticuerpo o celular frente a un antígeno de interés (por ejemplo, con fines de vacunación), pueden administrarse conjuntamente el antígeno y una molécula de unión de la invención (por ejemplo, administrarse conjuntamente al mismo tiempo en la misma composición o en composiciones separadas o de manera secuencial en el tiempo) de tal forma que se produce una respuesta inmunitaria potenciada. Pueden formularse el antígeno de interés y una molécula de unión conjuntamente en una sola composición farmacéutica o en composiciones separadas. En una realización, el antígeno de interés y la molécula de unión se administran simultáneamente al sujeto. Como alternativa, en determinadas situaciones, puede ser deseable administrar el antígeno en primer lugar y después la molécula de unión o viceversa (por ejemplo, puede ser beneficioso administrar en primer lugar solo el antígeno para estimular una respuesta y después, administrar una molécula de unión, sola o conjuntamente con un refuerzo de antígeno). En realizaciones preferidas, se administra una molécula de unión a GITR de la invención en el momento del cebado con el antígeno, es decir, en el momento de la primera administración de antígeno. Por ejemplo, el día -3, -2, -1, 0, +1, +2, +3. Un día particularmente preferido para la administración de una molécula de unión a GITR de la invención es el día -1 antes de la administración del antígeno.

Un antígeno de interés es, por ejemplo, uno capaz de proporcionar protección en el sujeto frente a la exposición a un agente infeccioso del que procede el antígeno o que es capaz de afectar al crecimiento y la metástasis tumoral de un modo que es beneficioso para un sujeto. Los antígenos ejemplares de interés incluyen, por lo tanto, aquellos procedentes de agentes infecciosos, células cancerosas y similares, en donde una respuesta inmunitaria dirigida contra el antígeno sirve para prevenir o tratar enfermedades causadas por el agente. Dichos antígenos incluyen, pero sin limitación, proteínas víricas, bacterianas, fúngicas o parasitarias, glucoproteínas, lipoproteínas, glucolípidos y similares. Los antígenos de interés también incluyen aquellos que proporcionan beneficios para un sujeto que se encuentra en riesgo de adquirir al que se ha diagnosticado que tiene un tumor y pueden incluir, por ejemplo, antígenos relacionados con tumores expresados exclusivamente o a niveles aumentados por las células tumorales. El sujeto es preferentemente un mamífero y lo más preferentemente, es un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento, el término "patógeno" o "agente patógeno" incluye microorganismos que son capaces de infectar o parasitar a hospedadores normales (por ejemplo, animales (tales como mamíferos, preferentemente primates, por ejemplo, seres humanos)). Tal como se usa en el presente documento, el término también incluye agentes oportunistas, por ejemplo, microorganismos que son capaces de infectar o parasitar a hospedadores anormales, por ejemplo, hospedadores en los que se ha suplantado la flora normal, por ejemplo, como resultado de un régimen de tratamiento u hospedadores inmunocomprometidos. Tal como se usa en el presente documento, el término también incluye microorganismos cuya replicación no se desea en un sujeto o moléculas tóxicas (por ejemplo, toxinas) producidas por los microorganismos.

Los ejemplos no limitantes de antígenos víricos incluyen, pero sin limitación, la nucleoproteína (NP) del virus de la gripe y las proteínas Gag del VIH. Otros antígenos heterólogos incluyen, pero sin limitación, la proteína Env del VIH o sus partes componentes, gp120 y gp41, la proteína Nef del VIH y las proteínas Pol del VIH, retrotranscriptasa y proteasa. Además, pueden usarse otros antígenos víricos, tales como antígenos del virus del Ébola (EBOV), tales como, por ejemplo, NP o glucoproteína (GP) de EBOV, ya sea de longitud completa o con GP eliminada en la región de mucina de la molécula (Yang Z-Y, et al. (2000) Nat Med 6:886-9, 2000), antígenos de viruela, virus de la hepatitis A, B o C, rinovirus humano, tal como de tipo 2 o de tipo 14, virus del herpes simple, poliovirus de tipo 2 o 3, virus de la fiebre aftosa (FMDV), virus de la rabia, rotavirus, virus de la gripe, virus de coxsackie, virus del papiloma humano (HPV), por ejemplo, el virus del papiloma de tipo 16, la proteína E7 del mismo y fragmentos que contienen la proteína E7 o sus epítomos; y el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV). Los antígenos de interés no se limitan necesariamente a antígenos de origen vírico. Se incluyen antígenos parasíticos, tales como, por ejemplo, antígenos de la malaria, así como antígenos fúngicos, antígenos bacterianos y antígenos tumorales, que también pueden usarse en conexión con las composiciones y métodos divulgados. Los ejemplos no limitantes de antígenos bacterianos incluyen: *Bordetella pertussis* (por ejemplo, los antígenos de proteína P69 y de hemaglutinina filamentosa (FHA)), antígenos de *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis*, y *E. coli* tales como la subunidad B de la toxina termolábil (LT-B) de *E. coli*, los antígenos K88 de *E. coli* y los antígenos enterotoxigénicos de *E. coli*. Otros ejemplos de antígenos incluyen los antígenos de glutatión S-transferasa P28 de *Schistosoma mansoni* (antígenos P28) y antígenos de duelas, Mycoplasma, lombrices intestinales, platelmintos, *Chlamydia trachomatis* y parásitos de la malaria, por ejemplo, parásitos de los géneros *plasmodium* o *babesia*, por ejemplo, *Plasmodium falciparum*, y péptidos que codifican epítomos inmunogénicos de los antígenos anteriormente mencionados.

Una infección, enfermedad o trastorno que puede tratarse o prevenirse mediante la administración de una vacuna de la invención incluye cualquier infección, enfermedad o trastorno en donde actúa una respuesta inmunitaria del hospedador para prevenir la infección, enfermedad o trastorno. Las enfermedades, trastornos o la infección que pueden tratarse o prevenirse mediante la administración de las composiciones inmunoestimuladoras de la invención incluyen, pero sin limitación, cualquier infección, enfermedad o trastorno causado por o relacionado con un hongo, parásito, virus o bacteria, enfermedades, trastornos o infecciones causados por o relacionados con diversos agentes usados en bioterrorismo, listeriosis, virus del Ébola, SARS, viruela, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C y hepatitis E, enfermedades y trastornos causados por rinovirus humano, VIH (por ejemplo, VIH-1 y VIH-2) y SIDA, Herpes, polio,

5 fiebre aftosa, rabia, enfermedades o trastornos causados por o relacionados con: rotavirus, gripe, virus coxsackie, virus del papiloma humano, SIV, malaria, cáncer, por ejemplo, tumores, virus del herpes humanos, citomegalovirus (especialmente humano), virus de Epstein-Barr, virus varicela zóster, virus de la hepatitis, tales como virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis C, paramixovirus: virus sincitial respiratorio, virus de
 10 parainfluenza, virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humano (por ejemplo, HPV6, 11, 16, 18 y similares), flavivirus (por ejemplo, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus de la encefalitis japonesa) o virus de la gripe, por ejemplo, gripe A (por ejemplo, subtipos, hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N)), gripe B y gripe C y enfermedades o trastornos causados por o relacionados con la infección por organismos bacterianos, incluyendo bacterias grampositivas o gramnegativas. Los ejemplos
 15 incluyen, pero sin limitación, *Neisseria spp.*, incluyendo *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis*, *Streptococcus spp.*, incluyendo *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. mutans*; *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenzae* de tipo B, *H. influenzae* no tipable, *H. ducreyi*; *Moraxella spp.*, incluyendo *M. catarrhalis*, también conocido como *Branhamella catarrhalis*; *Bordetella spp.*, incluyendo *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*;
 20 *Legionella spp.*, incluyendo *L. pneumophila*; *Escherichia spp.*, incluyendo *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatógena; *Vibrio spp.*, incluyendo *V. cholera*, *Shigella spp.*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp.*, incluyendo *Y. enterocolitica*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Campylobacter spp.*, incluyendo *C. jejuni* y *C. coli*; *Salmonella spp.*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp.*, incluyendo *H. pylori*; *Pseudomonas spp.*, incluyendo *P. aeruginosa*, *Staphylococcus spp.*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, incluyendo *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. difficile*; *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis*; *Corynebacterium spp.*, incluyendo *C. diphtheriae*; *Borrelia spp.*, incluyendo *B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. andersonii*, *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente de la erliquiosis granulocítica humana; *Rickettsia spp.*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, incluyendo *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*;
 25 *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum*, *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*. Las bacterias preferidas incluyen, pero sin limitación, *Listeria*, *mycobacteria*, *mycobacteria* (por ejemplo, *tuberculosis*), *Anthrax*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholerae*, *Mycoplasma*, lombrices intestinales, platelmintos, *Chlamydia trachomatis* y parásitos de la malaria.

30 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "infecciones bacterianas" incluye infecciones con una variedad de En otra realización, pueden extraerse linfocitos T de un paciente y ponerse en contacto *in vitro* con una molécula de unión anti-GITR, opcionalmente con una señal de activación (por ejemplo, antígeno más APC o un anticuerpo policlonal) y reintroducirse en el paciente.

35 Los linfocitos T reguladores desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la auto-tolerancia inmunológica mediante la supresión de respuestas inmunitarias contra enfermedades autoinmunitarias y el cáncer. Por consiguiente, en una realización, la anulación de la supresión de los linfocitos T efectores por parte de linfocitos T reguladores podría ser beneficiosa para potenciar una respuesta inmunitaria en el cáncer. Por lo tanto, las moléculas de unión de la invención pueden usarse en el tratamiento de neoplasias malignas, para inhibir el crecimiento tumoral o las metástasis. Las moléculas de unión pueden administrarse de manera sistémica o local al sitio tumoral.

40 En una realización, la modulación de la función de GITR puede ser útil para inducir inmunidad tumoral, es decir, para el tratamiento de un sujeto con una enfermedad neoplásica o un cáncer. En una realización, una molécula de unión de la invención reduce el tamaño tumoral, inhibe el crecimiento tumoral y/o prolonga el tiempo de supervivencia de un sujeto portador de tumores. Puede administrarse una molécula de unión a GITR a un paciente que tiene células tumorales (por ejemplo, sarcoma, melanoma, linfoma, leucemia, neuroblastoma, carcinoma) para superar la
 45 tolerancia específica de tumores en el sujeto.

Por la expresión "antígeno relacionado con tumores", tal como se usa en el presente documento, se entiende un antígeno que afecta al crecimiento tumoral o a la metástasis en un organismo hospedador. El antígeno relacionado con tumores puede ser un antígeno expresado por una célula tumoral o puede ser un antígeno que se expresa por una célula no tumoral, pero que cuando se expresa, promueve el crecimiento o la metástasis de células tumorales.
 50 Los tipos de antígenos tumorales y de antígenos relacionados con tumores incluyen cualquier antígeno tumoral conocido o desconocido hasta ahora, incluyendo, sin limitación, el antígeno bcr/abl en la leucemia, los antígenos HPVE6 y E7 del virus oncogénico asociado con el cáncer de cuello de útero, los antígenos MAGE1 y MZ2-E en o asociados con el melanoma y los antígenos MVC-1 y HER-2 en o asociados con el cáncer de mama.

55 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad neoplásica" se caracteriza por el crecimiento de tumores malignos o en patologías caracterizadas por células hiperproliferativas e hiperplásicas benignas. El significado médico común del término "neoplasia" se refiere a un "nuevo crecimiento celular" que es el resultado de la pérdida de sensibilidad a controles del crecimiento normales, por ejemplo, crecimiento celular neoplásico.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "hiperproliferativo", "hiperplásico", "maligno" y "neoplásico" se usan de manera intercambiable y se refieren a aquellas células en un estado anormal o afección caracterizada

por una rápida proliferación o neoplasia. Se pretende que los términos incluyan todos los tipos de crecimiento hiperproliferativo, crecimiento hiperplásico, crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados a malignos, independientemente del tipo histopatológico o del estado de invasividad. Una "hiperplasia" se refiere a células que sufren una velocidad de crecimiento anormalmente elevada.

5 Sin embargo, tal como se usa en el presente documento, los términos neoplasia e hiperplasia pueden usarse de manera indistinta, como revelará el contexto, haciendo referencia generalmente a células que sufren velocidades de crecimiento celular anormales. Las neoplasias e hiperplasias incluyen "tumores", que pueden ser benignos, premalignos o malignos.

10 Los términos "neoplasia", "hiperplasia" y "tumor" normalmente se citan de manera común como "cáncer", que es un nombre general para más de 100 enfermedades que se caracterizan por un crecimiento anormal no controlado de células. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación: de mama; de colon; de pulmón no microcítico, de cabeza y cuello; colorrectal; de pulmón; de próstata; de ovario; renal; melanoma; y cáncer gastrointestinal (por ejemplo, pancreático y de estómago); y sarcoma osteogénico.

15 En una realización, el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en: cáncer de páncreas, melanomas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer bronquial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de cerebro o del sistema nervioso central, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer de esófago, cáncer de cuello de útero, cáncer de útero o de endometrio, cáncer de la cavidad oral o la faringe, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de testículos, cáncer de las vías biliares, cáncer de intestino delgado o de apéndice, cáncer de glándulas salivales, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, osteosarcoma, condrosarcoma, cáncer de tejidos hematológicos.

20 Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un método para tratar una enfermedad neoplásica o un cáncer en un sujeto, preferentemente un ser humano u otro animal mediante la administración a dicho sujeto o animal una cantidad eficaz de una molécula de unión de la invención. Un experto en la materia es capaz, mediante experimentación rutinaria, de determinar cuál será una cantidad eficaz de polipéptido con el fin de tratar una enfermedad neoplásica o un cáncer. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión de la invención puede variar dependiendo de factores tales como el estadio de la enfermedad (por ejemplo, estadio I frente a estadio IV), la edad, el sexo, las complicaciones (por ejemplo, afecciones o enfermedades inmunosuprimidas) y el peso del sujeto y de la capacidad de la molécula de unión para desencadenar una respuesta deseada en el sujeto. Puede ajustarse la pauta posológica para proporcionar una respuesta terapéutica y/o profiláctica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas a diario o puede reducirse la dosis proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. En general, sin embargo, se espera que una dosis eficaz se encuentre en el intervalo de aproximadamente 0,05 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal al día y más preferentemente, de aproximadamente 0,5 a 10 miligramos por kilogramo de peso corporal al día.

35 *Métodos para potenciar respuestas inmunológicas*

Las presentes moléculas de unión también pueden usarse en métodos para potenciar respuestas inmunológicas. La regulación positiva de las respuestas inmunológicas puede ser potenciando una respuesta inmunológica existente o desencadenando una respuesta inmunológica inicial. Por ejemplo, la potenciación de una respuesta inmunológica mediante la modulación de GITR puede ser útil en casos de infección vírica. Ya que las moléculas de unión anti-GITR actúan potenciando respuestas inmunológicas, serían terapéuticamente útiles en situaciones donde sería beneficiosa una eliminación rápida o exhaustiva de agentes patógenos, por ejemplo, bacterias y virus. Por consiguiente, las moléculas de unión anti-GITR de la invención podrían usarse terapéuticamente, ya sea solas o en combinación con un antígeno o un agente inmunoestimulador adicional, para tratar a un sujeto que padece una enfermedad o trastorno, tal como una enfermedad infecciosa o una neoplasia maligna, por ejemplo, aquellas listadas anteriormente.

También pueden usarse las moléculas de unión anti-GITR de manera profiláctica en vacunas contra diversos patógenos. La inmunidad contra un patógeno, por ejemplo, un virus, puede introducirse vacunando con una proteína viral conjuntamente con una molécula de unión a GITR (como se ha descrito anteriormente). Como alternativa, puede usarse para la vacunación un vector de expresión que codifica genes tanto para un antígeno patógeno como para una molécula de unión a GITR, por ejemplo, un vector de expresión de virus vaccinia modificado por ingeniería genética para expresar un ácido nucleico que codifica una proteína vírica y un ácido nucleico que codifica una molécula de unión a GITR. Los patógenos para los que pueden ser útiles las vacunas incluyen, por ejemplo, hepatitis B, hepatitis C, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, HIV-1, HIV-2, gripe, tuberculosis, malaria y esquistosomiasis.

55 La presente invención se refiere además a terapias a base de moléculas de unión que implican la administración de moléculas de unión de la invención a un animal, preferentemente un mamífero y lo más preferentemente, un paciente humano para tratar, detectar y/o prevenir una o más de las enfermedades, trastornos o afecciones divulgadas. Los compuestos terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, moléculas de unión de la invención (incluyendo análogos y derivados de las mismas, como se describen en el presente documento) y

moléculas de unión anti-idiotípicas como se describen en el presente documento. Puede usarse una molécula de unión de la invención para tratar, diagnosticar, inhibir o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociados con una actividad aberrante de GITR, incluyendo, pero sin limitación, una cualquiera o más de las enfermedades, trastornos o afecciones descritos en el presente documento (por ejemplo, pueden proporcionarse moléculas de unión de la invención en composiciones farmacéuticamente aceptables, tal como se sabe en la técnica o como se describe en el presente documento).

Ventajosamente, puede usarse una molécula de unión de la presente invención en combinación con otras moléculas de unión monoclonales o quiméricas o con linfocinas o factores de crecimiento hematopoyéticos (tales como, por ejemplo, IL-2, IL-3 e IL-7), por ejemplo, que sirven para aumentar el número o la actividad de células efectoras que interactúan con una molécula de unión.

Puede administrarse una molécula de unión de la invención sola o en combinación con otros tipos de tratamientos (por ejemplo, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia y agentes antitumorales, antibióticos, terapia dirigida contra un agente patógeno (tal como, por ejemplo, un agente inmunoterapéutico o quimioterapéutico eficaz contra un patógeno vírico o un antígeno bacteriano) y agentes inmunoestimuladores. También puede administrarse una molécula de unión de la invención en combinación con un antígeno frente al cual se desea una respuesta inmunitaria potenciada, por ejemplo, una vacuna o un antígeno de un agente patógeno (o una forma atenuada de un virus o bacteria) o un antígeno de un tumor, como se ha descrito anteriormente. En una realización, se administra una molécula de unión de la invención sola o en terapia combinada a un sujeto con una infección. En otra realización, se administra una molécula de unión de la invención sola o en combinación a un sujeto con una infección vírica crónica. En otra realización más, se administra una molécula de unión de la invención sola o en combinación a un sujeto con cáncer.

En general, se prefiere la administración de moléculas de unión procedentes de una especie que es la misma que la del paciente. Por lo tanto, en una realización preferida, se administran moléculas de unión humanas, derivados, análogos o ácidos nucleicos a un paciente humano para terapia o profilaxis.

25 VI. *Composiciones Farmacéuticas*

Puede incorporarse una molécula de unión de la invención en composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende una molécula de unión de la invención y un transportador farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "transportador farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, isotónicos y agentes de retraso de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Se conoce bien en la técnica el uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en el caso de que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su ruta de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen parenteral, por ejemplo, administración intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, por inhalación) transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringuillas desechables o viales multidosis hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles (en los casos donde sean hidrosolubles) y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen suero salino fisiológico, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o suero salino tamponado con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición ha de ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que pueda inyectarse fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y ha de preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse una fluidez adecuada, por ejemplo, usando un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. Puede lograrse la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares,

polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro sódico en la composición. Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado al vacío y criodesecado, que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución de los mismos previamente esterilizado por filtración.

15 Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un transportador comestible. Pueden atraparse en cápsulas de gelatina o compactarse formando comprimidos. Con el objetivo de administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también pueden prepararse usando un transportador fluido para su uso como enjuague bucal, en donde el compuesto en el transportador líquido se aplica por vía oral se usa como enjuague y se expectora o ingiere. Pueden incluirse como parte de la composición agentes aglutinantes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa, un agente disgregante, tal como ácido alginico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante, tal como estearato de magnesio o Sterotes; un emoliente, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante, tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

25 Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de una pulverización de aerosol a partir de un recipiente o dispensador a presión que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas, tal como dióxido de carbono o un nebulizador.

30 La administración sistémica también puede ser por medios transmucosa o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes adecuados para la barrera a permear. Dichos agentes penetrantes se conocen generalmente en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse mediante el uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, salvas, geles o cremas, tal como se conoce de manera general en la técnica.

35 Los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases para supositorios convencionales, tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para suministro rectal.

40 En una realización, se prepara una molécula de unión de la invención con portadores que protegerán al compuesto contra su rápida eliminación del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de liberación microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para preparar dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente a través de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También pueden usarse suspensiones liposómicas como transportadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 4.522.811.

45 Es especialmente ventajoso formular las composiciones orales o parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosificación unitaria usada en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico necesario. La especificación para las formas de dosis unitaria de la invención está dictada por y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico concreto que se vaya a lograr y de las limitaciones inherentes en la técnica de formar compuestos de dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

55 La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichas composiciones puede terminarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de la dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse

como la proporción DL50/DE50. Se prefieren compuestos que muestren elevados índices terapéuticos. Aunque pueden usarse compuestos que muestren efectos secundarios tóxicos, ha de tenerse cuidado de diseñar un sistema de suministro que dirija dichos compuestos al sitio de tejido afectado para minimizar el daño potencial a células no infectadas y, de este modo, reducir los efectos secundarios.

- 5 Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y de estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferentemente dentro del intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, puede estimarse inicialmente la dosis terapéuticamente eficaz a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una
- 10 dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma que incluye la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.
- 15 Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, paquete o dispensador junto con instrucciones para su administración.

VII. Administración de las moléculas de unión de la invención

Las moléculas de unión de la invención se ponen en contacto con células de un sujeto en una forma biológica compatible *in vitro* o *in vivo*. Por "forma biológicamente compatible" se entiende una forma del agente que se va a administrar en la que cualquier efecto tóxico se ve superado por los efectos terapéuticos de la molécula de unión.

20

En una realización, las presentes composiciones se administran a un sujeto. La administración de una cantidad terapéuticamente activa de las composiciones terapéuticas de la presente invención se define como una cantidad eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios para lograr el resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de molécula de unión puede variar dependiendo de factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo y de la capacidad de la molécula de unión para desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Las pautas posológicas pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas a diario o puede reducirse la dosis proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

25

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de una molécula de unión de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de unión puede variar dependiendo de factores, tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo y de la capacidad de la molécula de unión para desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que los efectos tóxicos o perjudiciales de la molécula de unión se ven superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

30

35

Pueden ajustarse las pautas posológicas para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosificación unitaria usada en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se vayan a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico necesario. La especificación para las formas de dosis unitaria de la invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico o profiláctico concreto que se vaya a lograr y de (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formar compuestos de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

40

45

50

Un intervalo ejemplar, no limitante para una cantidad terapéutica o profilácticamente activa de una molécula de unión de la invención es, por ejemplo, de aproximadamente 0,1-25 mg/kg, de aproximadamente 1,0-10 mg/kg, de aproximadamente 0,5-2,5 mg/kg, de aproximadamente 5-25mg/kg, de aproximadamente 1-400 mg/kg. Cabe destacar que los valores de dosificación pueden variar dependiendo del tipo y la gravedad de la afección que se vaya a aliviar. Además, hay que entender que, para cualquier sujeto particular, deben ajustarse las pautas

55

posológicas específicas con el paso del tiempo según las necesidades del individuo y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones y que los intervalos de dosificación expuestos en el presente documento son únicamente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada. Los intervalos adicionales no limitantes para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una molécula de unión de la invención son de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg y de aproximadamente 0,01 a 5 mg/kg (por ejemplo, 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1mg/kg, 2 mg/kg, etc.), del peso corporal del sujeto. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o de 10 mg/kg de peso corporal o estar en el intervalo de 1-10 mg/kg, preferentemente, al menos 1 mg/kg. También se pretende que se encuentren dentro del alcance de la invención dosis intermedias en los intervalos anteriores.

5 Pueden administrarse dichas dosis a los sujetos a diario, en días alternos, semanalmente o según cualquier otra pauta determinada mediante análisis empírico. Un tratamiento ejemplar implica la administración en múltiples dosis durante un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Los regímenes de tratamiento ejemplares adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Las pautas posológicas ejemplares incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanalmente.

Las moléculas de unión de la invención pueden administrarse en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser, por ejemplo, diarios, semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, según se indiquen midiendo los niveles sanguíneos de la molécula de unión en el paciente.

20 Opcionalmente, pueden administrarse las moléculas de unión en combinación con otros agentes que son eficaces para tratar el trastorno o la afección que necesite tratamiento (por ejemplo, profiláctico o terapéutico). Los agentes adicionales preferidos son aquellos que están reconocidos en la técnica y se administran de manera estándar para un trastorno particular.

25 La molécula de unión puede administrarse de un modo conveniente, tal como mediante inyección (subcutánea, intravenosa, etc.), administración oral, inhalación, aplicación transdérmica o administración rectal. Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo puede recubrirse en un material para proteger al compuesto frente a la acción de las enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto. Por ejemplo, para administrar el agente por una vía distinta a la administración parenteral, puede ser deseable recubrir o administrar conjuntamente el agente con un material para impedir su inactivación.

30 Una molécula de unión de la presente invención puede administrarse mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la vía/modo de administración preferida es inyección o infusión intravenosa. Como apreciarán lo expertos en la materia, la vía y/o el modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En determinadas realizaciones, el compuesto activo puede prepararse con un transportador que protegerá al compuesto contra su rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados.

35 Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliláctico, colágeno, polioctoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o se conocen generalmente por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

40 En determinadas realizaciones, una molécula de unión de la invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un transportador comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también puede atraparse en una cápsula de gelatina de vaina dura o blanda, compactarse formando comprimidos o incorporarse directamente a la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica por vía oral, los compuestos pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos,

45 cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto de la invención por una vía distinta a la administración parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto o administrarlo conjuntamente con un material para impedir su inactivación.

Las moléculas de unión pueden administrarse conjuntamente con inhibidores enzimáticos o en un vehículo adecuado, tal como liposomas. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones salinas y soluciones acuosas tamponadas. El término adyuvante se emplea en su sentido más amplio e incluye cualquier compuesto inmunoestimulante, tal como interferón. Los adyuvantes contemplados en el presente documento incluyen resorcinoles, tensioactivos no iónicos, tales como oleiléter de polioxietileno y n-hexadecil éter de polietileno. Los inhibidores enzimáticos incluyen inhibidor de tripsina pancreática, diisopropilfluorofosfato (DEEP) y trasilol. Los liposomas incluyen emulsiones de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales (Sterna et al. (1984),

55 J. Neuroimmunol. 7:27).

El compuesto activo también puede administrarse por vía parenteral o intraperitoneal. Las dispersiones también

pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

5 Cuando el compuesto activo se encuentra protegido de una manera adecuada, como se ha descrito anteriormente, la molécula de unión puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un transportador comestible asimilable.

10 También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones. En determinadas realizaciones, se formula y/o administra conjuntamente una molécula de unión de la invención con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, puede formularse y/o administrarse conjuntamente una molécula de unión anti-GITR de la invención con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otras dianas, por ejemplo, anticuerpos que se unen a otras citocinas o que se unen a moléculas de la superficie celular. Dichas terapias combinadas pueden utilizar ventajosamente dosis menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando de este modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

15 La presente invención abarca además moléculas de unión conjugadas a un agente diagnóstico o terapéutico. Una molécula de unión puede usarse de manera diagnóstica para, por ejemplo, monitorizar el desarrollo o la progresión de un tumor como parte de un procedimiento clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento concreto. La detección puede facilitarse acoplando el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones
20 usando diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse ya sea de manera directa a la molécula de unión o de manera indirecta, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse a moléculas de unión para su uso como agentes de diagnóstico de acuerdo con la presente
25 invención. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos con grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes
30 incluyen luciferasa, luciferina y acuorina; y los ejemplos de un material radiactivo adecuado son I^{125} , I^{131} , I^{111} , In^{99Tc} .

Además, puede conjugarse una molécula de unión a un resto terapéutico, tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico, un ion metálico radiactivo, por ejemplo, emisores alfa, tales como, por ejemplo, ^{213}Bi , toxinas biológicas, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores
35 de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos, ligandos inmunológicamente activos (por ejemplo, linfocinas u otros anticuerpos). En otra realización, puede conjugarse una molécula de unión de la invención a una molécula que reduce la vascularización de tumores. En otras realizaciones, las composiciones divulgadas pueden comprender moléculas de unión de la invención acopladas a fármacos o profármacos. Otras realizaciones más de la presente invención comprenden el uso de moléculas de unión de la invención conjugadas a biotoxinas específicas o a sus fragmentos citotóxicos, tales como ricina, gelonina, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica. La selección en
40 cuanto a qué molécula de unión conjugada o no conjugada se va a usar depende del tipo y el estadio del cáncer, el uso de un tratamiento adjunto (por ejemplo, quimioterapia o radiación externa) y el estado del paciente. Se apreciará que un experto en la materia podría efectuar fácilmente dicha selección a la vista de las enseñanzas del presente documento.

45 Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por
50 ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

55 La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos, que no deben considerarse limitantes. Los ejemplos que no se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones tienen fines únicamente ilustrativos.

Ejemplos

Se usaron los siguientes materiales y métodos en algunos ejemplos:

Métodos

Cultivo de líneas de linfocitos T

- 5 Se produjeron líneas celulares diferenciadas a partir de células preparadas de sangre de cordón umbilical o de linfocitos T vírgenes CD4+CD45RA+ de sangre periférica humana mediante una diversidad de métodos, incluyendo citometría de flujo y separaciones con perlas magnéticas. La pureza de las poblaciones iniciales era >95%. Después, se estimularon las células mediante anticuerpos para CD3 y CD28 en medio RPMI 1640 con FCS al 10% y suero AB humano al 1% con mezclas definidas de citocinas y anticuerpos neutralizantes para las citocinas, para producir los
- 10 tipos celulares diferenciados. Se produjeron células Th1 mediante cultivo con IL-12 (62 U/ml) y anti-IL-4 (0,2 µg/ml); Se produjeron células Th2 mediante cultivo en IL-4 (145 U/ml) y anti-IL-12 (10 µg/ml) y anti-IFNγ (10 µg/ml); y los linfocitos T reguladores se produjeron mediante cultivo en TGFβ (32 U/ml), IL-9 (42 U/ml), anti-IL-4 (10 µg/ml), anti-IL-12 (10 µg/ml) y anti-IFNγ (10 µg/ml). (Nota: no se usó anti-IL-12 en todos los experimentos). Todos los cultivos se complementaron con IL-2 (65 U/ml) e IL-15 (4500 U/ml). Las células se dividieron en placas de cultivo más grandes
- 15 según se necesitase debido a la división celular.

EJEMPLO 1: Aislamiento y purificación de 6C8

El anticuerpo 6C8 es una IgG2b, kappa. La purificación de este anticuerpo reveló la presencia de una doble cadena pesada (figura 1). Esto puede deberse a una glucosilación alternativa o a la contaminación con otro Ab. La cromatografía de exclusión por tamaños mostró la presencia de un pico (figura 2).

- 20 El anticuerpo 6C8 se purificó del siguiente modo:

1. Se lavó con 20 ml de Proteína G (Pharmacia HR 10/30) con 5 VC de dPBS
2. Se cargó 1 l (ciclo 1) o 2 l (ciclo 2) de sobrenadante de hGTTR (6C8)
3. Se lavó con 10 VC de dPBS
4. Se eluyó con citrato 100 mM, pH 2,8 directamente en Tris 1 M (al 20-25% v:v)
5. Se destiló con citrato 100 mM, pH 2,8, NaCl 0,3 M

25

EJEMPLO 2: Caracterización de 6C8

El anticuerpo 6C8 se une a células transfectadas con GITR-L-M (figura 3) y a PBL activadas (figura 4). La curva de saturación de anti-GITR marcado con biotina en linfocitos activados sugiere una buena afinidad relativa (figura 5).

- 30 El anticuerpo 6C8 es coestimulador en linfocitos T activados con anti-CD3 subóptimo (figura 6). Este anticuerpo no coestimula hasta el mismo nivel que CD28, pero es comparable al anti-GITR comercial (R&D).

El anticuerpo 6C8 no induce apoptosis en linfocitos activados (figura 7). Los linfocitos se activaron con PHA durante 3 días antes de la adición del anticuerpo. En comparación con YTH 655 (anti-CD2 humano que se sabe que induce apoptosis en linfocitos activados) 6C8 no aumenta la apoptosis de linfocitos T activados.

- 35 El anticuerpo 6C8 no bloquea una reacción linfocitaria mixta primaria (MLR) (figura 8). Se usó TRX1 (anti-CD4 humano) como control positivo para la MLR.

EJEMPLO 3: El anticuerpo 6C8 anula la supresión de los linfocitos T efectores inducida por parte de linfocitos T reguladores

- 40 El anticuerpo 6C8 fue capaz de bloquear la supresión inducida por linfocitos T reguladores (figura 9). Se añadieron células CD4+/CD25+ a células CD4+/CD25- a diversas proporciones. Las células se estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la placa. Una proporción 1:1 de células CD4+/CD25+ fue capaz de anular la proliferación de las células CD4+/CD25-. La adición de 6C8 a los cultivos fue capaz de bloquear la supresión de una manera dependiente de la dosis.

- 45 Cuando se estimularon los linfocitos T solo con anti-CD3 (sin coestimulación con anti-CD28) no se observó supresión con la adición de células CD4+/CD25+ a las células CD4+/CD25-, de hecho, el anticuerpo anti-GITR fue ligeramente coestimulador en estas condiciones (figura 10).

EJEMPLO 4: El anticuerpo 6C8 modula la señalización a través de NF-κB

La activación de los linfocitos T a través de CD3 o de CD3 y CD28 da como resultado la activación de las vías de señalización de I-κB, según se evaluó tanto por la fosforilación de I-κB (fig. 12 y 14) como por su posterior degradación (fig. 11 and 13).

- 5 Tal como se presenta en la fig. 11, en condiciones de activación parcial, el anti-GITR tiene un efecto significativo en la señalización de I-κB, según se evalúa por la degradación dependiente del tiempo de I-κB. En presencia de la molécula de unión a GITR, la degradación se atenúa significativamente, en todos los instantes analizados. Los cambios anteriores tienen una buena correlación con la reducción de la fosforilación de I-κB (fig.12).

- 10 Curiosamente, la magnitud de la respuesta es mayor para TH2 y Treg frente a TH1. Además, la expresión de GITR parece ser mayor en células TH1, en comparación con las células TH2 y Treg, (según se evalúa mediante la MCF (fluorescencia de canal medio)) en experimentos paralelos. Los linfocitos T completamente activados mediante la reticulación con CD3 y CD28 pierden su sensibilidad a anti-GITR, aunque conservan completamente la activación de I-κB a través de TNF-α.

EJEMPLO 5: El anticuerpo 6C8 potencia la respuesta inmunitaria

- 15 El modelo de tumor de melanoma B16 es un modelo de melanoma agresivo que se ha usado para estudiar el papel de los linfocitos T reguladores en el cáncer. El tratamiento de ratones con un anticuerpo eliminador anti-CD25o anti-CTLA-4 ha mostrado resultados prometedores en este modelo. En ambos casos, los tratamientos fueron capaces de retrasar la aparición del tumor y el tamaño del tumor. Ya que GITR se expresa en células CD25+ y puede estar implicada en la anulación de la supresión de los linfocitos T reguladores, se trató a ratones portadores de tumores
- 20 B16 con la molécula de unión anti-GITR para determinar si se producía un efecto en la aparición del tumor o el tamaño del tumor. El tratamiento con la molécula de unión anti-GITR un día después de inyectar el tumor a los ratones dio como resultado una aparición retrasada y un tamaño del tumor reducido (figura 17). Además, seguía habiendo ratones en el grupo tratado con GITR que seguían libres de tumores al final del estudio.

- 25 A todos los animales se les inyectaron 10^4 células de melanoma B16 en su flanco derecho en el día 0. Los grupos de GITR recibieron 2 miligramos, 1 miligramo, 0,5 miligramos o 0,2 miligramos de molécula de unión anti-GITR en el día 1. Los tumores medibles fueron visibles a partir del día 16.

EJEMPLO 6: La administración simultánea de anti-GITR y de antígeno da como resultado un efecto adyuvante

- 30 Se investigó adicionalmente el efecto adyuvante de un anticuerpo anti-mGITR en la respuesta humoral contra ovoalbúmina (Ova) o hemaglutinina (HA). Se trató a los ratones sin anticuerpo, con YAML (control de isotipo) o con 2F8 (anti-mGITR de rata) en los días -1, 0 y 1 a razón de 0,4 mg/día. Para investigar la importancia del acoplamiento al receptor de Fc en el mecanismo de acción de la molécula de unión, se trató a un grupo adicional de animales con 6 mg/día de F(ab')₂ de 2F8 en los días -1, 0 y 1. Esta dosis se seleccionó basándose en la corta semivida de F(ab')₂ en comparación con el anticuerpo completo. Se inmunizó a los ratones con Ova (100 µg) o HA (10 µg) en el día 0.
- 35 Se expuso a los ratones tratados con Ova a 100 µg de Ova en el día 14 y después se les extrajo sangre en los días 21 y 28 para obtener muertas de suero para ensayos ELISA. Se expuso a los ratones tratados con HA a 5 µg de HA en el día 14 y también se les extrajo sangre en los días 21 y 28.

- 40 Se monitorizaron las concentraciones séricas de 2F8 y de F(ab')₂ de 2F8 para evaluar los perfiles farmacocinéticos de las moléculas de unión. En el día 1, los niveles séricos de la molécula de unión en los ratones tratados con 2F8 o con el F(ab')₂ de 2F8 eran comparables. La molécula de unión se detectó en los ratones tratados con 2F8 hasta el día 9, mientras que los ratones tratados con el fragmento F(ab')₂ de 2F8 solo tuvieron niveles detectables de molécula de unión hasta el día 3, a pesar de la dosis 15X mayor.

- 45 Los resultados demuestran que, en la rama de HA del estudio, los ratones tratados con 2F8 tuvieron un aumento de 4 y 5 veces en los anticuerpos anti-HA en comparación con animales tratados sin anticuerpo y un aumento de 18 y 20 veces en los anticuerpos anti-HA en comparación con los ratones tratados con YAML en los días 21 y 28, respectivamente (figura 19). El título anti-HA observado con el anticuerpo anti-mGITR como adyuvante es comparable al título observado cuando se administró HA con adyuvante incompleto de Freund (IFA). Esto sugiere que la respuesta observada con el anticuerpo anti-mGITR es comparable a la de uno de los adyuvantes más potentes frecuentemente utilizado en estudios inmunológicos.

- 50 En la rama de Ova del estudio, los ratones tratados con 2F8 tuvieron un aumento de 13 y 6 veces en los anticuerpos anti-Ova en comparación con animales tratados sin anticuerpo y un aumento de 17 y 8 veces en los anticuerpos anti-Ova en comparación con los ratones tratados con YAML en el día 21 el día 28, respectivamente (figura 20). El efecto del anticuerpo 2F8 en la respuesta frente a Ova fue comparable a la respuesta observada frente a HA. Los ratones

5 tratados con el F(ab')₂ de 2F8 tuvieron un aumento de 4 y 3 veces en los anticuerpos anti-Ova en comparación con los animales tratados sin anticuerpo y un aumento de 6 y 5 veces en los anticuerpos anti-Ova en comparación con los ratones tratados con YAML en el día 21 y el día 28, respectivamente (figura 20). La dosis del F(ab')₂ y el diferente perfil farmacocinético en comparación con el anticuerpo completo puede explicar la respuesta anti-Ova reducida cuando se compara con los ratones tratados con 2F8.

Conjuntamente, estos datos demuestran que el efecto del anticuerpo 2F8 en la respuesta humoral frente al antígeno puede atribuirse predominantemente a la porción F(ab')₂ del anticuerpo y que el acoplamiento al receptor de Fc puede no ser necesario para el efecto adyuvante del anticuerpo anti-mGITR.

EJEMPLO 7: Preparación de una molécula de unión anti-GITR quimérica

10 Se injertó la región variable de cadena ligera de 6C8 en una región constante de cadena ligera humana usando técnicas de biología molecular convencionales. Se usó la región constante de cadena ligera de IgG1. A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de la molécula de unión a GITR completa quimérica en la cadena ligera:

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASY
 RYSGVDPDRFTGSGSGTDFLTINN^VHSEDLAEYFCQQYNTDPLTFGAGTKLEIKR
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
 VTEQDSKDS^TYSLSS^TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 (SEQ ID NO:22).

15 También se injertó la cadena pesada variable de 6C8 en una región constante de cadena pesada humana usando técnicas de biología molecular convencionales. Se usó la región constante de cadena pesada de IgG1. A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de la molécula de unión a GITR completa quimérica en la cadena pesada (también denominada "Gly"):

QVTLKESGPGILKPSQTL^SLTCSFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIW
 WDDDKYYNPSLKSQ^LTISKDTSRNQVFLKITSVDTADAATYYCARTRRYFPFAY
 WGQGT^LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV^TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
 VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV^SHE
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY^NSTYR^VVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY^TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV^FSCSVM
 HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:23).

20 Ya que la secuencia de aminoácidos NX(S/T) es una secuencia consenso putativa para un sitio de glucosilación que puede afectar a la producción de la molécula de unión, y la región constante de IgG1 de la cadena pesada de 6C8 tiene la secuencia NST, se preparó una segunda versión de la región constante de cadena pesada para sustituir de manera conservativa una asparagina por una glutamina en el resto de aminoácido 299 (en negrita y subrayado anteriormente) de la SEQ ID NO: 23. Por consiguiente, se injertó una segunda región constante humana en la región variable de cadena pesada de 6C8. A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de la molécula de
 25 unión a GITR completa quimérica en la cadena pesada (también denominada "Agly"):

QVTLKESGPGILKPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIW
 WDDDKYYNPSLKSQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADAATYYCARTRRYFPFAY
 WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
 VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM
 HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:24).

EJEMPLO 8: Preparación de formas humanizadas de la molécula de unión anti-GITR 6C8

Se usó la estrategia basada en la homología de las CDR descrita en Hwang et al. (2005) Methods (36) 35-42 para humanizar a 6C8. Se efectuó una búsqueda por BLAST de las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera usando una base de datos disponible públicamente y los resultados indicaron que 6C8 tenía una estructura canónica de cadena pesada 3-1 y una estructura canónica de cadena ligera 2-1-1. A partir de esto, se compararon todos los genes V de cadena kappa de línea germinal con una estructura canónica 2-1-1 en la base de datos IMGT con la secuencia del anticuerpo 6C8. Esto mismo se efectuó para la cadena pesada, donde se compararon todos los genes V de cadena pesada de línea germinal 3-1 con la secuencia de aminoácidos de 6C8. Se compararon únicamente las secuencias de las CDR y se seleccionaron los marcos basándose en qué secuencias de línea germinal tenían las mayores coincidencias en las CDR. (véanse los alineamientos más adelante).

Para la cadena ligera, se seleccionó la secuencia 3-15*01, que tenía 14 coincidencias en las CDR. Ya que la CDR3 termina en leucina y treonina, se usó la secuencia de segmento génico J Jk4.

Genes V de cadena ligera con estructura canónica 2-1-1

Nombre del gen	CDR1	CDR2	CDR3	ID
IGKV1-5	RASQSISWLA.....	DASSLES	QQYNSYS..	11
IGKV1-6	RASQGIRNDLG	AASSLSQ	LQDYNYP..	9
IGKV1-9	RASQGISSYLA	AASLQS	QQLNSYP..	11
IGKV1-12	RASQGISSWLA	AASSLQS	QQANSFP..	11
IGKV1-16	RASQGISSWLA	AASSLQS	QQYNSYP..	12
IGKV1D-16	RARQGISSWLA	AASSLQS	QQYNSYP..	11
IGKV1-17	RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYP..	9
IGKV1-27	RASQGTSNYLA.....	AASLQS	QKYNSAP..	11
IGKV1-33	QASQDISNYLN.....	DASNLET	QQYDNLN..	9
IGKV1-39	RASQSISYLN	AASSLQS	QQSYSTP..	9
IGKV1D-43	WASQGISSYLA	YASSLQS	QQYYSTP..	11
IGKV3-11	RASQSVSSYLA	DASNRAT	QQRSNWP..	11
IGKV3D-11	RASQGVSSYLA.....	DASNRAT	QQRSNWH..	10
IGKV3-15	RASQSVSSNLA.....	GASTRAT	QQYNNWP..	14
6C8	KASQNVGTNVA	SASYRYS	QQYNTDP	

5 Se compararon todos los genes V de cadena ligera kappa de línea germinal con una estructura canónica 2-1-1 en la base de datos IMGT con la secuencia del anticuerpo 6C8. Esto mismo se efectuó para la cadena pesada, donde se compararon todos los genes V de cadena pesada de línea germinal 3-1 con la secuencia de aminoácidos de 6C8.

Usando esta metodología, se preparó una versión de la cadena ligera: EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQNVGTNVAWYQKPGQAPRLLIYSASYRYSIGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNTDPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 44) (las CDR están en cursiva)

10 Para la cadena pesada, la secuencia 2-05*01 tenía 17 coincidencias. Sin embargo, las secuencias alrededor de la CDR3 eran diferentes a las de 6C8 (YYCAR frente a YYCAHR). Ya que se ha demostrado que la CDR3 es la CDR más importante para el reconocimiento, es importante mantener esta área lo más perfectamente emparejada posible. La secuencia 2-70*01 tenía 16 coincidencias en las CDR y las secuencias justo antes de la CDR3 se emparejaron perfectamente con las de 6C8 y por lo tanto, se seleccionó 2-70*01.

15 Para el segmento génico J de la cadena pesada, JH4 tenía el mayor número de coincidencias y por lo tanto se seleccionó. Después, se retrotradujeron las secuencias de aminoácidos y se obtuvieron cebadores correspondientes a la secuencia de nucleótidos deseada de IDT (Coralville, IA).

Genes V de cadena pesada con estructura canónica 3-1

Nombre del gen	CDR1	CDR2	ID
IGHV2-5	TSGVGVG ...	LIYWDDDKRYSPSLKS	17
IGHV2-26	NARMGVS....	HIFSNDEKSYSTSLKS	12
IGHV2-70	TSGMCVS ...	LIDWDDDKYYSTSLKT	16
IGHV4-30-2	SGGYSWS ...	YIYHSGSTYYNPSLKS	10
IGHV4-30-4	SGDYYSWS....	YIYSGSTYYNPSLKS	9
IGHV4-31	SGGYYSWS ...	YIYSGSTYYNPSLKS	9
IGHV4-39	SSSYWWS....	SIYSGSTYYNPSLKS	10
IGHV4-61	SGSYYSWS....	YIYSGSTNYNPSLKS	8
6C8	TSGMGVG	HIWWDDDKYYNPSLKS	

20 Usando esta metodología, se preparó una versión de la cadena pesada: QVTLRESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPPGKALEWLAHIWWDDDKYYNPSLKSRLTISKDTSK

NQVVLMTNMDPVDATYYCARTRRYFPFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 53) (también denominada "N").

Ya que la secuencia de aminoácidos NX(S/T) es una secuencia consenso putativa para un sitio de glucosilación que puede afectar a la producción de la molécula de unión, y la CDR2 de la cadena pesada de 6C8 tiene la secuencia NPS,

5 se preparó una segunda versión de la cadena pesada para sustituir de manera conservativa una asparagina por una glutamina en el resto de aminoácido 62 (en negrita y subrayado anteriormente) de la SEQ ID NO: 53. Por consiguiente, se preparó una segunda versión de la cadena pesada: QVTLRESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTSGMGVGVIRQPPGKALEWLAHIWDDDKYYQPSLKSRLTISKDTSK NQVVLMTNMDPVDATYYCARTRRYFPFAYW GQGLVTVSS (SEQ ID NO: 54) (también denominada "Q").

10 También se efectuó un alineamiento de múltiples secuencias con CLUSTAL W (1.82) (usando una matriz de puntuación Blosum con una penalización por hueco de 10) de la región variable de cadena ligera de 6C8 y la secuencia de cadena ligera de línea germinal 3-15*01. Los resultados se presentan a continuación:

```

6C8          DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCASQNVGTNVAWYQOKPGQSPKALIYSASYRSGVPD
3-15*01      EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQOKPGQAPRLLIYGASTRATGIPA
              :*****  :*. * *:*.:::*.***.*.:*:*:*****:*.: ***.** * :*:
              *

6C8          ðFTGSGSGTDFTLTINNVSIEDLAEYFCQYNTDPLTFGAGTKLEIK
3-15*01      RFGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQYNNWP-----
              **:*****:*****.:*:*:* * :*****. *
  
```

15 Basándose en los análisis de CLUSTAL W, se identificaron varios restos de aminoácidos en el marco humano para su potencial sustitución por restos de aminoácidos correspondientes a los restos del marco de 6C8 en la cadena ligera de 6C8 humanizada. Específicamente, la E en la posición 1, la P en la posición 8, la A en la posición 9, la T en la posición 10, la L en la posición 11, la V en la posición 13, la P en la posición 15, la E en la posición 17, la A en la posición 19, la T en la posición 20, la L en la posición 21, la S en la posición 22, la A en la posición 43, la R en la posición 45, la L en la posición 46, la I en la posición 58, la A en la posición 60, la S en la posición 63, la E en la posición 70, la S en la posición 76, la S en la posición 77, la L en la posición 78, la Q en la posición 79, la F en la posición 83, la V en la posición 85, la Y en la posición 87, la G en la posición 100 y la V en la posición 104.

25 De manera similar, también se efectuó un alineamiento de múltiples secuencias con CLUSTAL W (1.82) (usando una matriz de puntuación Blosum con una penalización por hueco de 10) de la región variable de cadena pesada de 6C8 y las proteínas de la cadena de línea germinal con una secuencia de aminoácidos 2-70*01. Los resultados se presentan a continuación:

```

6C8          QVTLKESGPGILKPSQTLTSLTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWDDDKY
2-70*01      QVTLRESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTSGMVCVSWIRQPPGKALEWLALIDWDDDKY
              ****:***.:*:*:*:*:*:***** * .*****.***.***** * *****
              *

6C8          YNPSLKSQTLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADAATYYCARTRRYFPFAYWGQGLVTVSS
2-70*01      YSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARI-----
              *..***:*****:***.*.:*:*:* * :*****
  
```

30 Basándose en los análisis de CLUSTAL W, se identificaron varios restos de aminoácidos en el marco humano para su potencial sustitución por restos de aminoácidos correspondientes a los restos del marco de 6C8 en la cadena pesada de 6C8 humanizada. Específicamente, la R en la posición 5, la A en la posición 10, la L en la posición 11, la V en la posición 12, la T en la posición 15, la T en la posición 19, la T en la posición 23, la P en la posición 43, la A en la posición 46, la R en la posición 68, la K en la posición 77, la V en la posición 81, la T en la posición 83, la M en la posición 84, la N en la posición 86, la M en la posición 87, la P en la posición 89, la V en la posición 90 y/o la T en la posición 92.

35 Se prepararon cuatro moléculas de unión 6C8 humanizadas de longitud completa que tenían las siguientes combinaciones de cadena pesada y ligera humanizadas:

- Versión de longitud completa 1 (HuN6C8-Gly) - cadena ligera (L) de 6C8 humanizada (Hu)/cadena pesada humanizada con la N en la CDR2 ("N") y que comprende una región constante que tiene una N ("Gly")
- Versión de longitud completa 2 (HuN6C8-Agly) - cadena ligera (L) de 6C8 humanizada (Hu)/cadena pesada humanizada con la N en la CDR2 ("N") y que comprende una región constante que tiene una A ("Agly")
- 40 Versión de longitud completa 3 (HuQ6C8-Gly) - cadena ligera (L) de 6C8 humanizada (Hu)/cadena pesada humanizada con la Q en la CDR2 ("Q") y que comprende una región constante que tiene una N ("Gly")

Versión de longitud completa 4 (HuQ6C8-Agly) - cadena ligera (L) de 6C8 humanizada (Hu)/cadena pesada humanizada con la Q en la CDR2 ("Q") y que comprende una región constante que tiene una A ("Agly")

A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada de IgG1 glucosilada que se usó para preparar las moléculas de unión de longitud completa:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK (SEO ID NO:55).

5

A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada de IgG1 no glucosilada que se usó para preparar las moléculas de unión de longitud completa:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK (SEQ ID NO:56).

10

A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera de IgG1 que se usó para preparar las moléculas de unión de longitud completa:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
 (SEQ ID NO:57).

A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos completa de la cadena ligera de 6C8 humanizada:

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVGTNVAWYQQKPGQAPRLLIYSASYR
 YSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNTDPLTFGGGTKVEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
 EQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ
 ID NO:58).

Puede incluirse opcionalmente la secuencia líder METQSQVFVYMLLWLSGVDG (SEQ ID NO: 59).

15 A continuación, se muestran las secuencias de aminoácidos completas de las versiones de cadena pesada de 6C8 humanizadas HuN6C8-Agly, HuQ6C8-Gly y HuQ6C8-Agly:

HuN6C8-Gly

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPPGKALEWLAHIW
WDDDKYYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARTRRYFPFA
YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:60);

HuN6C8-Agly

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPPGKALEWLAHIW
WDDDKYYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARTRRYFPFA
YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:61);

5 HuQ6C8-Gly

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPPGKALEWLAHIW
WDDDKYYQPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARTRRYFPFA
YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:62);

^y
HuQ6C8-Agly

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPPGKALEWLAHIW
WDDDKYYQPQLKSRITISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARTRRYFPFA
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:63).

Puede incluirse opcionalmente la secuencia líder MDRLTFSFLLLVIPAYVLS (SEQ ID NO: 64).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> SMITH, L. MARY SZYMANSKA, GRAZYNA PONATH, PAUL ROSENZWEIG, MICHAEL
<120> MOLÉCULAS DE UNIÓN A GITR Y USOS DE LAS MISMAS
<130> TLN-029PC
10 <140>
<141>
<150> 60/665.322
15 <151> 25-03-2005
<150> 60/687.265
<151> 03-06-2005
20 <160> 69
<170> PatentIn Ver. 3.3
<210> 1
25 <211> 138
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 1
30

ES 2 657 443 T3

Met Asp Arg Leu Thr Phe Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys
 20 25 30
 Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45
 Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg
 85 90 95
 Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Ala Ala
 100 105 110
 Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 2
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 2

Met Glu Thr Gln Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser
 1 5 10 15
 Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser
 20 25 30
 Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn
 35 40 45
 Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 50 55 60
 Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 85 90 95
 Asn Val His Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn
 100 105 110
 Thr Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

10

<210> 3

ES 2 657 443 T3

<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 3

10 Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly
1 5 10

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

20 <400> 4

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 5
25 <211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 5

Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr
1 5

35 <210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 6

45 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 7
50 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 657 443 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 7

5

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 8

<211> 9

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

15

<400> 8

Gln Gln Tyr Asn Thr Asp Pro Leu Thr
1 5

20

<210> 9

<211> 414

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

25

<400> 9

```

atggacagac ttacattctc attcctgctg ctgattgtcc ctgcatatgt cttgtcccaa 60
gttactctaa aagagtctgg ccttgggata ttgaagccct cacagaccct cagtctgact 120
tgttctttct ctgggttttc actgagcact tctggtatgg gtgtaggctg gattcgtcag 180
ccttcaggga agggctctgga gtggctggcg cacatttggg gggatgatga taagtactat 240
aatccatccc tgaagagcca gctcacaatc tccaaggata cctccagaaa ccagggtattc 300
ctcaagatca ccagtgtgga cactgcagat gctgccactt actactgtgc tcgaactagg 360
aggtacttcc cttttgetta ctggggccaa gggacactag tcacagtctc ctca 414
    
```

30

<210> 10

<211> 381

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

35

<400> 10

```

atggagacac agtctcaggt ctttgtatac atgttgctgt ggttgtcttg tgttgatgga 60
gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 120
gtcacctgca aggccagtc gaatgtgggt actaatgtag cctggtatca acagaaacca 180
gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcacccatcc ggtacagtgg agtccctgat 240
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaacaa tgtgcaactct 300
gaagacttgg cagagtattt ctgtcaacaa tataacaccg atccgctcac gttcggagct 360
gggaccaagc tggaaatcaa a
    
```

40

<210> 11

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 657 443 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 11
gggtttcac tgagcacttc tggatgggt gtaggc 36

5

<210> 12
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 12
cacatttggg gggatgatga taagtactat aatccatccc tgaagagc 48

15

<210> 13
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 13
actaggaggt acttcccctt tgcttac 27

25

<210> 14
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 14
aaggccagtc agaattgtggg tactaatgta gcc 33

35

<210> 15
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 15
tcggcatcct accggtacag t 21

45

<210> 16
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

55

ES 2 657 443 T3

<400> 16
caacaatata acaccgatcc gctcacg 27

5 <210> 17
<211> 1214
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 17

```

gtctacaccc cctcctcaca cgcacttcac ctgggtcggg attctcaggt catgaacggt 60
cccagccacc tccgggcagg gcgggtgagg acggggacgg ggcgtgtcca actggctgtg 120
ggctctttaa acccgagcat ggcacagcac ggggcgatgg gcgcgtttcg ggccctgtgc 180
ggcctggcgc tgctgtgcgc gctcagcctg ggtcagcgcc ccaccggggg tcccgggtgc 240
ggccctgggc gcctcctgct tgggacggga acggacgcgc gctgctgccg ggttcacacg 300
acgcgctgct gccgcgatta cccgggcgag gagtgtgttt ccgagtggga ctgcatgtgt 360
gtccagcctg aattccactg cggagaccct tgctgcacga cctgccggca ccacccttgt 420
ccccaggcc aggggttaca gtcccagggg aaattcagtt ttggcttcca gtgtatcgac 480
tgtgctcgg ggaccttctc cggggggccac gaaggccact gcaaaccttg gacagactgc 540
accagttcg ggtttctcac tgtgttcctt ggaacaaga ccacaacgc tgtgtgcgtc 600
ccagggtccc cgccggcaga gccgcttggg tggctgaccg tegtctcctt ggccgtggcc 660
gctgctgctc tcctcctgac ctccggcccag cttggactgc acatctggca gctgaggagt 720
cagtgcattg ggccccgaga gaccagctg ctgctggagg tgccgcctgc gaccgaagac 780
gccagaagct gccagttccc cgaggaagag cggggcgagc gatcggcaga ggagaagggg 840
cggtcgggag acctgtgggt gtgagcctgg ccgtcctcct gggccaccga ccgcagccag 900
cccctcccc aaggctcccc aggcgcgagg ggctctgctt tctgctctgg gccgggccc 960
gtccccctgg cagcagaagt ggggtgcagga aggtggcagt gaccagcgcc ctggaccatg 1020
cagttcggcg gccgcggctg ggccctgcag gagggagaga gagacacagt catggcccc 1080
ttcctccctt gctggccctg atgggggtgg gtcttaggac gggaggctgt gtccgtgggt 1140
gtgcagtgcc cagcacggga cccggctgca ggggacctt aataaacact tgtccagtga 1200
aaaaaaaaaa aaaa 1214

```

15 <210> 18
<211> 241
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 18

ES 2 657 443 T3

Met Ala Gln His Gly Ala Met Gly Ala Phe Arg Ala Leu Cys Gly Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Cys Ala Leu Ser Leu Gly Gln Arg Pro Thr Gly Gly Pro
 20 25 30
 Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg
 35 40 45
 Cys Cys Arg Val His Thr Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu
 50 55 60
 Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Met Cys Val Gln Pro Glu Phe His
 65 70 75 80
 Cys Gly Asp Pro Cys Cys Thr Thr Cys Arg His His Pro Cys Pro Pro
 85 90 95
 Gly Gln Gly Val Gln Ser Gln Gly Lys Phe Ser Phe Gly Phe Gln Cys
 100 105 110
 Ile Asp Cys Ala Ser Gly Thr Phe Ser Gly Gly His Glu Gly His Cys
 115 120 125
 Lys Pro Trp Thr Asp Cys Thr Gln Phe Gly Phe Leu Thr Val Phe Pro
 130 135 140
 Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val Cys Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala
 145 150 155 160
 Glu Pro Leu Gly Trp Leu Thr Val Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys
 165 170 175
 Val Leu Leu Leu Thr Ser Ala Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu
 180 185 190
 Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val
 195 200 205
 Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu
 210 215 220
 Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp
 225 230 235 240
 Val

<210> 19

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

10

<400> 19

ES 2 657 443 T3

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Gln Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 20

<211> 105

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 20

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 1 5 10 15

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 35 40 45

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 65 70 75 80

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 85 90 95

10 Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu
 100 105

<210> 21

<211> 334

15 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 21

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45

Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met

ES 2 657 443 T3

50						55						60			
Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Gln	Thr	Val
65					70					75					80
Thr	Cys	Ser	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Thr	Val	Asp	Lys	Lys
				85					90					95	
Leu	Glu	Pro	Ser	Gly	Pro	Ile	Ser	Thr	Ile	Asn	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Lys	Glu	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
		115					120					125			
Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Asn	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Thr
	130					135					140				
Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp
145					150					155					160
Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln
				165					170					175	
Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Ile	Arg	Val	Val	Ser
			180					185					190		
Thr	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys
		195					200					205			
Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile
	210					215					220				
Ser	Lys	Ile	Lys	Gly	Leu	Val	Arg	Ala	Gln	Val	Tyr	Ile	Leu	Pro	Pro
225					230					235					240
Pro	Ala	Glu	Gln	Leu	Ser	Arg	Lys	Asp	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
				245					250					255	
Val	Gly	Phe	Asn	Pro	Gly	Asp	Ile	Ser	Val	Glu	Trp	Thr	Ser	Asn	Gly
			260					265					270		
His	Thr	Glu	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asp	Thr	Ala	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
		275					280					285			
Gly	Ser	Tyr	Phe	Ile	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Met	Lys	Thr	Ser	Lys	Trp
	290					295					300				
Glu	Lys	Thr	Asp	Ser	Phe	Ser	Cys	Asn	Val	Arg	His	Glu	Gly	Leu	Lys
305					310					315					320
Asn	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Lys	Thr	Ile	Ser	Arg	Ser	Pro	Gly	Lys		
				325					330						

<210> 22

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 657 443 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética de cadena ligera de humano/ratón

<400> 22

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1           5           10           15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
          20           25           30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
          35           40           45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Val His Ser
 65           70           75           80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Asp Pro Leu
          85           90           95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
          100          105          110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
          115          120          125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
          130          135          140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
          145          150          155          160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
          165          170          175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
          180          185          190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
          195          200          205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

```

5

<210> 23

<211> 449

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética de cadena pesada de humano/ratón

15 <400> 23

ES 2 657 443 T3

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

ES 2 657 443 T3

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 24

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Cadena pesada quimérica completa sintética de humano/ratón

<400> 24

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

ES 2 657 443 T3

<210> 25

<211> 95

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro
 85 90 95

10

<210> 26

<211> 95

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 26

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Pro Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp His
 85 90 95

20

<210> 27

<211> 95

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 27

ES 2 657 443 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
 85 90 95

5 <210> 28
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Arg Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
 85 90 95

10 <210> 29
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 29

ES 2 657 443 T3

Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Phe Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Lys Ala Pro Lys Leu Phe Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro
 85 90 95

<210> 30
 <211> 95
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro
 85 90 95

10
 <210> 31
 <211> 95
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 31

ES 2 657 443 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Gly Tyr Ser Thr Pro
 85 90 95

<210> 32
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro
 85 90 95

10

<210> 33
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 33

ES 2 657 443 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro
 85 90 95

<210> 34
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 34

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro
 85 90 95

10

<210> 35
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 35

ES 2 657 443 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro
 85 90 95

<210> 36
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 36

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro
 85 90 95

10

<210> 37
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 37

ES 2 657 443 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Arg Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro
 85 90 95

<210> 38
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 38

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro
 85 90 95

10

<210> 39
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

ES 2 657 443 T3

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro
 85 90 95

<210> 40
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 40

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro
 85 90 95

10

<210> 41
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 41

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro
 85 90 95

ES 2 657 443 T3

<210> 42
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 42

```

Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1                               5                               10                               15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
                               20                               25                               30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
                               35                               40                               45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50                               55                               60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65                               70                               75                               80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro
                               85                               90                               95
  
```

10 <210> 43
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 43

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1                               5                               10                               15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
                               20                               25                               30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
                               35                               40                               45
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50                               55                               60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65                               70                               75                               80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser
                               85                               90                               95
  
```

20 <210> 44
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Construcción de proteína sintética

ES 2 657 443 T3

<400> 44

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Asp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 45
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 45

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

15 <210> 46
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 46

ES 2 657 443 T3

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala
 20 25 30
 Arg Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Asn Asp Glu Lys Ser Tyr Ser Thr Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ile
 100

<210> 47
 <211> 100
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 47

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Cys Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Leu Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
 50 55 60
 Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ile
 100

10
 <210> 48
 <211> 99
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 48

ES 2 657 443 T3

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ser Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30
 Gly Tyr Ser Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg

<210> 49
 <211> 99
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 49

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30
 Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg

10
 <210> 50
 <211> 99
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 50

ES 2 657 443 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30
 Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Leu Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg

<210> 51

<211> 99

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 51

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg

10

<210> 52

<211> 99

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 52

ES 2 657 443 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
 20 25 30
 Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg

5 <210> 53
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Construcción de proteína sintética
 <400> 53

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

15 <210> 54
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 657 443 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Construcción de proteína sintética

<400> 54

5

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Gln Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80
Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 55

<211> 330

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Construcción de proteína sintética

15

<400> 55

ES 2 657 443 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

ES 2 657 443 T3

210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro 225	Gln Val Tyr Thr Leu 230	Pro Pro Ser Arg Asp Glu 235 240
Leu Thr Lys Asn Gln 245	Val Ser Leu Thr Cys 250	Leu Val Lys Gly Phe Tyr 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val 260	Glu Trp Glu Ser Asn Gly 265	Gln Pro Glu Asn 270
Asn Tyr Lys Thr Thr 275	Pro Pro Val Leu Asp Ser 280	Asp Gly Ser Phe Phe 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 290	Val Asp Lys Ser Arg Trp 295 300	Gln Gln Gly Asn
Val Phe Ser Cys Ser 305	Val Met His Glu Ala 310	Leu His Asn His Tyr Thr 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser 325	Leu Ser Pro Gly Lys 330	

<210> 56

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Construcción de proteína sintética

<400> 56

ES 2 657 443 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

ES 2 657 443 T3

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 57

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Construcción de proteína sintética

<400> 57

ES 2 657 443 T3

```

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1          5          10          15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
          20          25          30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
          35          40          45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50          55          60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65          70          75          80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
          85          90          95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          100          105

```

<210> 58

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Construcción de proteína sintética

<400> 58

ES 2 657 443 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Asp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 59

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia líder de aminoácidos sintética

<400> 59

Met Glu Thr Gln Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser
 1 5 10 15
 Gly Val Asp Gly
 20

ES 2 657 443 T3

<210> 60

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Construcción de proteína sintética

10 <400> 60

```

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1                               5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
                20 25 30
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
          35 40 45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
          85 90 95
Cys Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
          100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
          115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
          130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
          165 170 175
    
```

ES 2 657 443 T3

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 61
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Construcción de proteína sintética

<400> 61

5

ES 2 657 443 T3

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

ES 2 657 443 T3

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 62

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Construcción de proteína sintética

10

<400> 62

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Gln Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

ES 2 657 443 T3

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 63

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Construcción de proteína sintética

10

<400> 63

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Gln Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

ES 2 657 443 T3

<210> 65

<211> 50

<212> ADN

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 65

10 cacatttggt gggatgatga taagtactat caaccatccc tgaagagcca 50

<210> 66

<211> 138

<212> PRT

15

<213> *Mus musculus*

<400> 66

Met Asp Arg Leu Thr Phe Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys
20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
65 70 75 80

Gln Pro Ser Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg
85 90 95

Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

20

<210> 67

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Construcción de proteína sintética

<400> 67

30

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

ES 2 657 443 T3

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe
 65 70 75 80
 Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Arg Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Glu Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Thr Ser
 115

<210> 68

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Construcción de proteína sintética

<400> 68

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val
 65 70 75 80
 Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente al recepto relacionado con el receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR) inducido por glucocorticoides (GITR) o un fragmento de unión a GITR del mismo, para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria inicial o potenciar una respuesta inmunitaria existente en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto el anticuerpo de unión a GITR o el fragmento de unión a GITR y un antígeno, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a GITR es agonista en presencia de CD3, se une específicamente a GITR en linfocitos T humanos y en células dendríticas humanas y tiene una constante de unión (Kd) de 1×10^{-9} o menor y comprende:
- (a) la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada es la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 66, en donde dichas secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada comprenden los restos de aminoácidos 45-56 de SEQ ID NO: 1, los restos de aminoácidos 119-127 de SEQ ID NO: 1 y los restos de aminoácidos 71-86 de SEQ ID NO: 1 o los restos de aminoácidos 71-86 de SEQ ID NO: 66; y
- (b) las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera es la SEQ ID NO: 2, en donde dichas secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera comprenden los restos de aminoácidos 44-54 de SEQ ID NO: 2, los restos de aminoácidos 70-76 de SEQ ID NO: 2 y los restos de aminoácidos 109-117 de SEQ ID NO: 2.
2. El anticuerpo o el fragmento de unión a GITR para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto comprende una fuente del antígeno.
3. El anticuerpo o el fragmento de unión a GITR para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el antígeno es un antígeno de un tumor o de un microorganismo infeccioso.
4. El anticuerpo o el fragmento de unión a GITR para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el uso comprende la administración del antígeno antes de la administración de o mediante la administración conjunta con, el anticuerpo de unión a GITR o el fragmento de unión a GITR.
5. El anticuerpo o el fragmento de unión a GITR para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, caracterizado por uno o más de los siguientes:
- (a) la unión del anticuerpo de unión a GITR o del fragmento de unión a GITR da como resultado la anulación de la supresión de un linfocito T efector por parte de un linfocito T regulador;
- (b) el anticuerpo de unión a GITR o el fragmento de unión a GITR potencia la proliferación de un linfocito T efector; y
- (c) la unión del anticuerpo de unión a GITR o del fragmento de unión a GITR a un linfocito T da como resultado la señalización inducida por el receptor de linfocitos T en un linfocito T efector.
6. El anticuerpo o el fragmento de unión a GITR para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el método comprende además: (a) administrar al menos un agente adicional seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo adicional que se une a otra diana, una lincina o un factor de crecimiento hematopoyético, en donde el al menos un agente adicional sirve para aumentar el número o la actividad de células efectoras que interactúan con el anticuerpo de unión a GITR o el fragmento de unión a GITR; o (b) al menos un tratamiento adicional.
7. El anticuerpo o el fragmento de unión a GITR para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el al menos un tratamiento adicional sirve para tratar una infección por un microorganismo infeccioso en el sujeto o un tumor en el sujeto.
8. El anticuerpo o el fragmento de unión a GITR para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde el al menos un tratamiento adicional se selecciona entre el grupo que consiste en radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, la inmunoterapia, tratamiento con un agente antitumoral y tratamiento con un antibiótico.
9. El anticuerpo o el fragmento de unión a GITR para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, 7 u 8 o la reivindicación 5 cuando depende de la reivindicación 3, en donde el tumor es un cáncer, por ejemplo, en donde el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer pancreático, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer bronquial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de cerebro o del sistema nervioso central, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer de esófago, cáncer de cuello de útero, cáncer de útero o de endometrio, cáncer de la cavidad oral o la faringe, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de testículos, cáncer de las vías biliares, cáncer de intestino delgado o de apéndice, cáncer de glándulas salivales, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, osteosarcoma, condrosarcoma y cáncer de tejidos hematológicos.

10. El anticuerpo o el fragmento de unión a G1TR para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3, 7 u 8 o la reivindicación 5 cuando depende de la reivindicación 3, en donde el microorganismo infeccioso es un virus, por ejemplo, en donde el virus se selecciona entre el grupo que consiste en virus del Ébola, VIH, virus del herpes humanos, citomegalovirus, rotavirus, virus de Epstein-Barr, virus varicela zóster, virus de la hepatitis, tales como virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis C y virus de la hepatitis E, paramixovirus, virus sincitial respiratorio, virus de parainfluenza, virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humano, flavivirus y virus de la gripe.

11. El anticuerpo o el fragmento de unión a G1TR para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3, 7 u 8 o la reivindicación 5 cuando depende de la reivindicación 3, en donde el microorganismo infeccioso es una bacteria, por ejemplo, en donde la bacteria se selecciona entre el grupo que consiste en *Neisseria* spp, *Streptococcus* spp, *S. mutans*, *Haemophilus* spp., *Moraxella* spp, *Bordetella* spp, *Mycobacterium* spp, *Legionella* spp, *Escherichia* spp, *Vibrio* spp, *Yersinia* spp, *Campylobacter* spp, *Salmonella* spp, *Listeria* spp., *Helicobacter* spp, *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp, *Clostridium* spp., *Bacillus* spp, *Corynebacterium* spp., *Borrelia* spp., *Ehrlichia* spp, *Rickettsia* spp, *Chlamydia* spp., *Leptospira* spp. y *Treponema* spp.

15

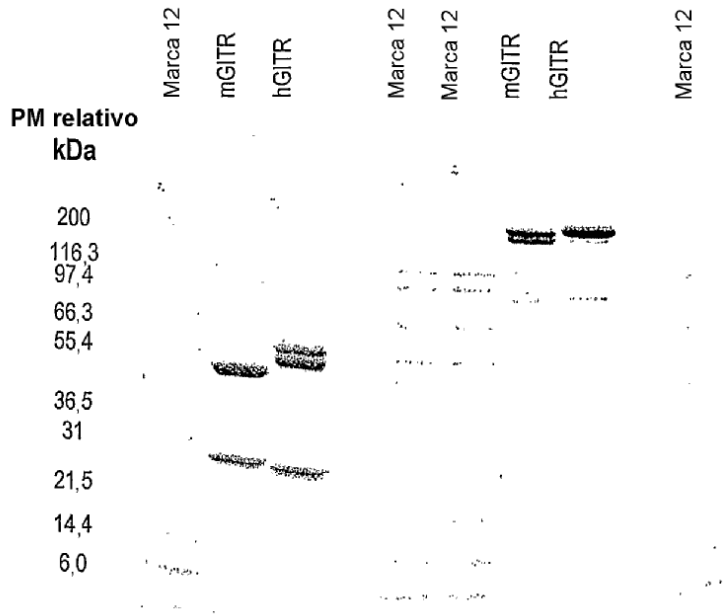


Fig. 1

Ratón anti-GITR humana (6C8)

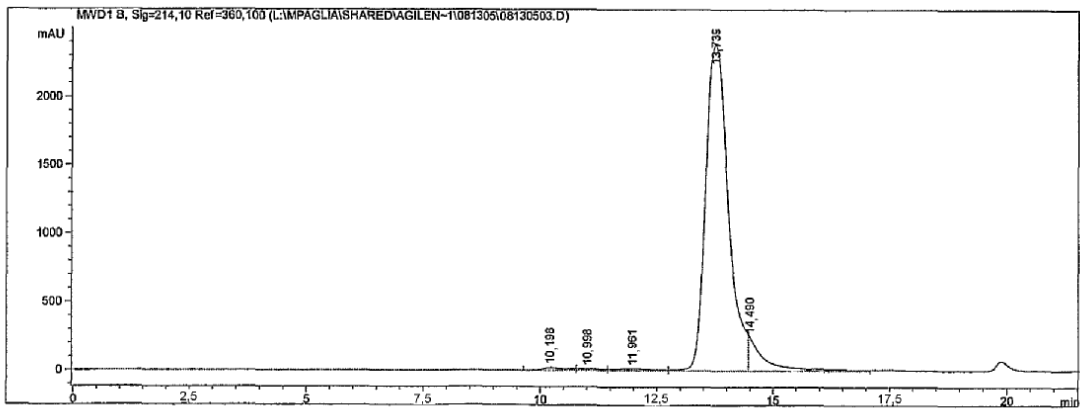


Fig. 2

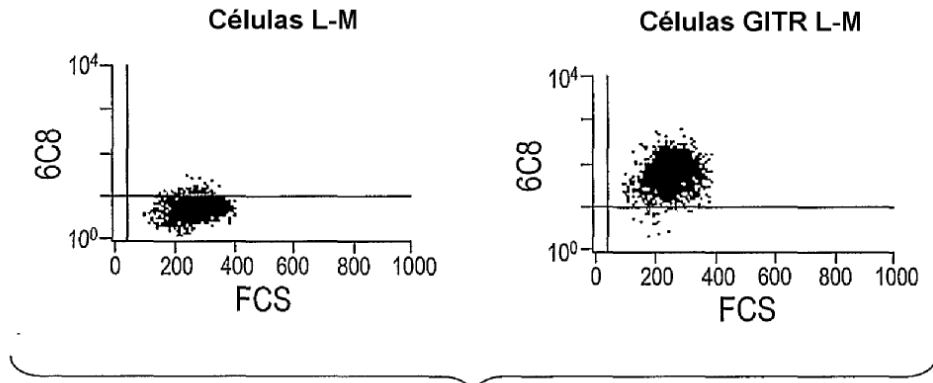


Fig. 3

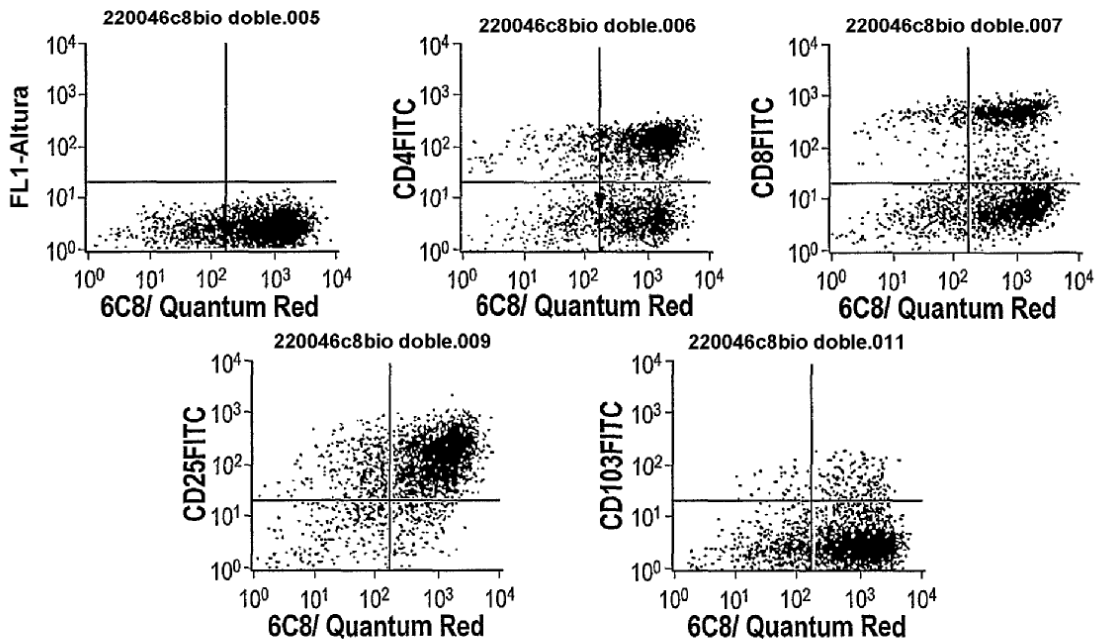


Fig. 4

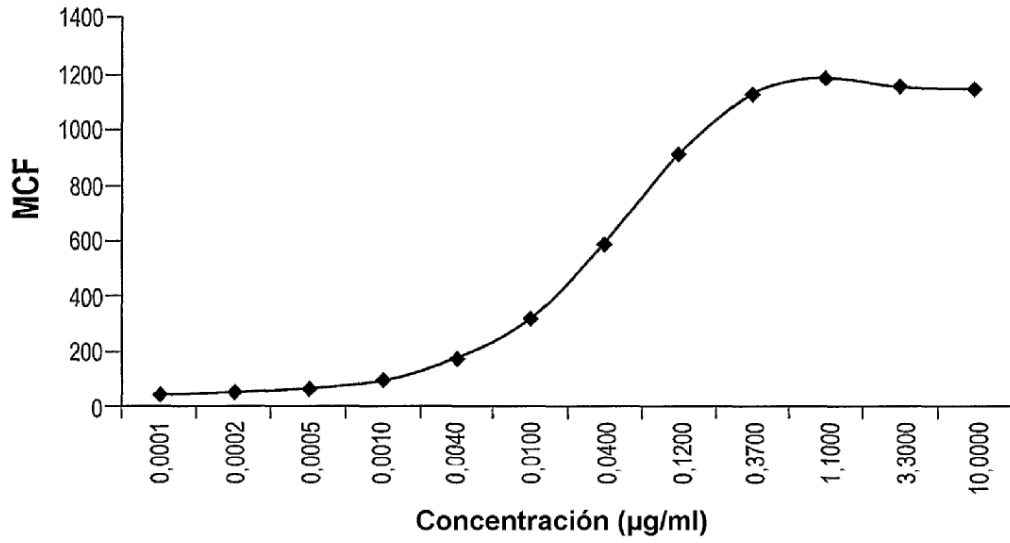


Fig. 5

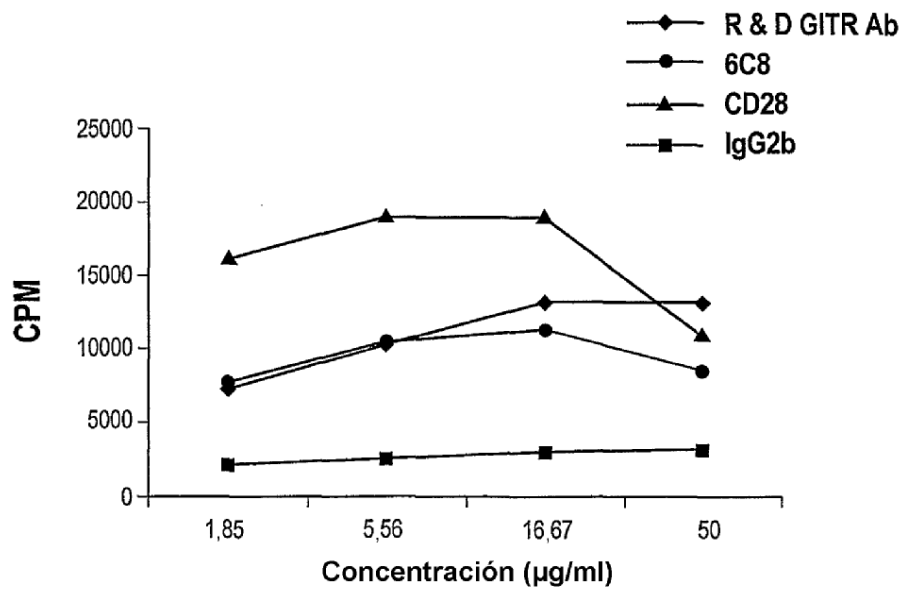


Fig. 6

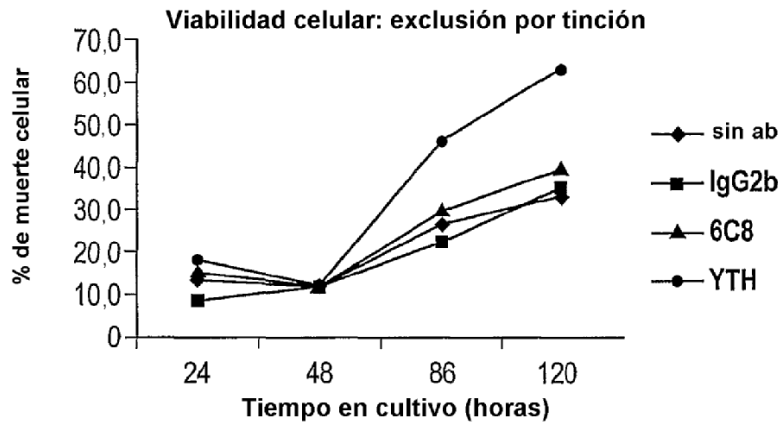


Fig. 7A

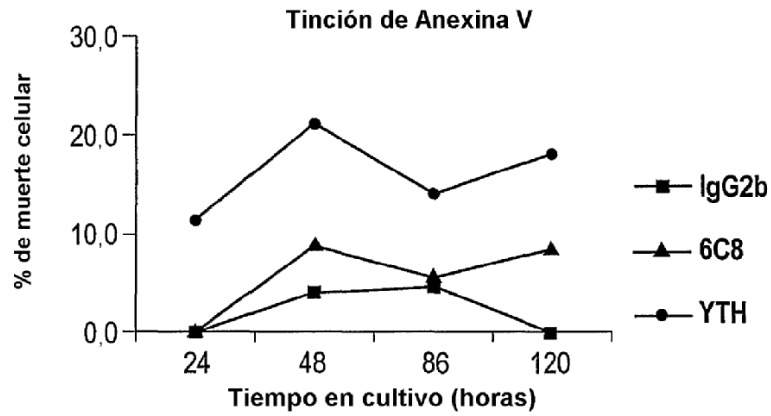


Fig. 7B

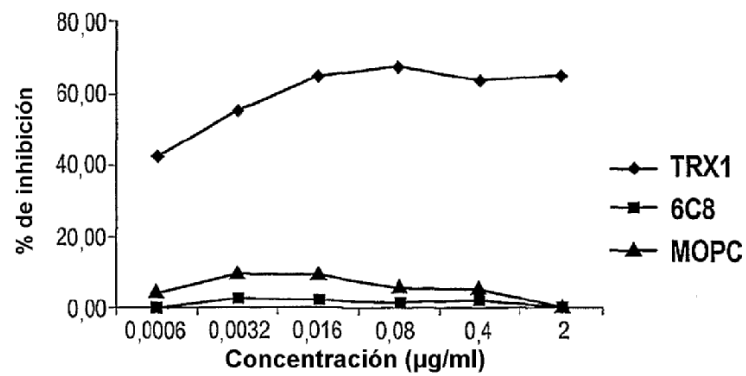


Fig. 8

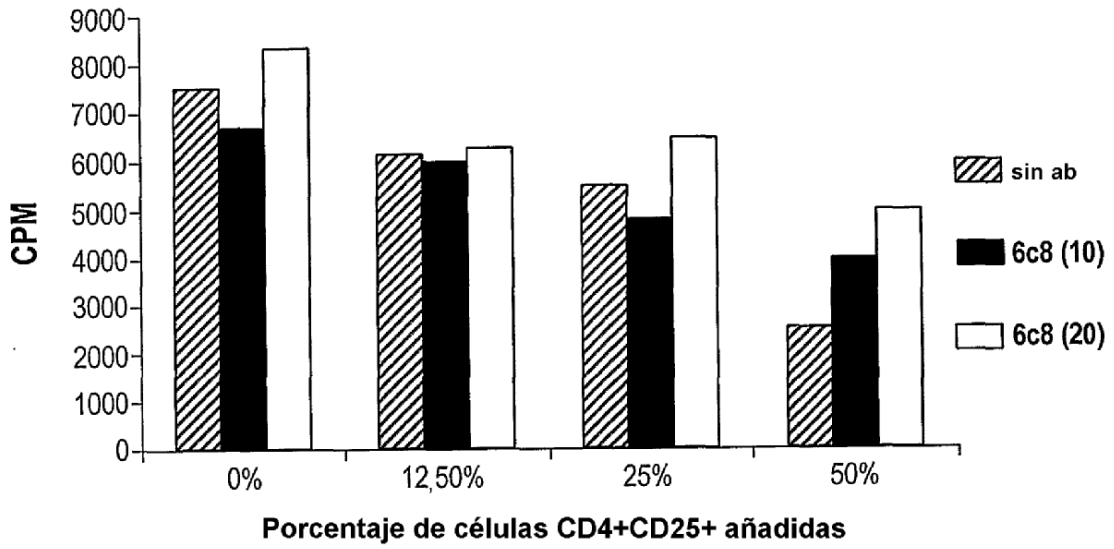


Fig. 9

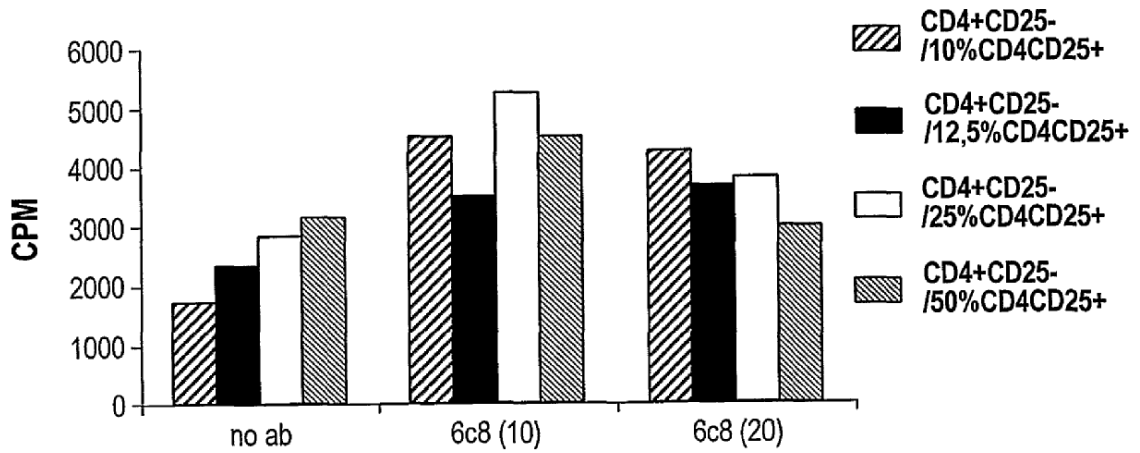


Fig. 10

Efecto de anti-GITR en la degradación de I- κ B (normalizada a β -actina); Activación a través de CD3

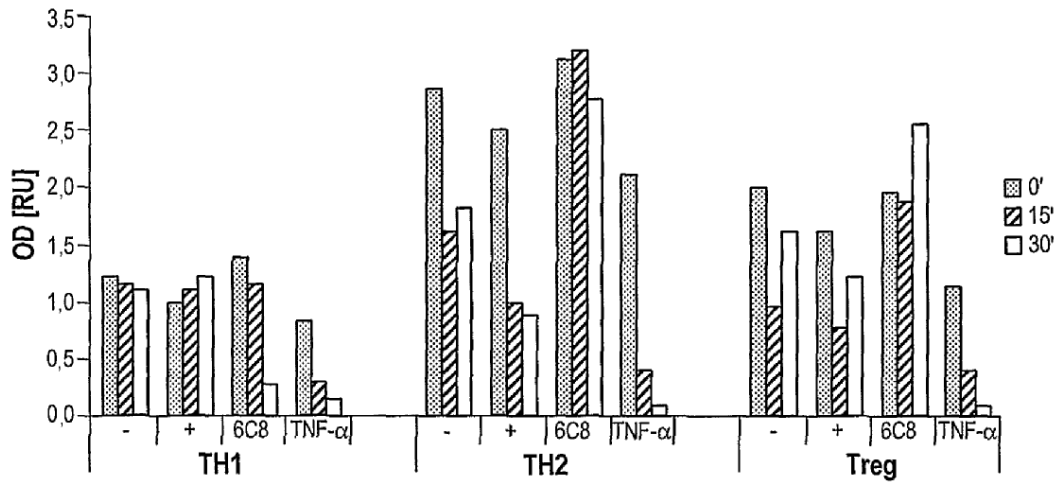


Fig. 11

Efecto de anti-GITR en la fosforilación de I- κ B (normalizada a I- κ B y β -actina total); Activación a través de CD3

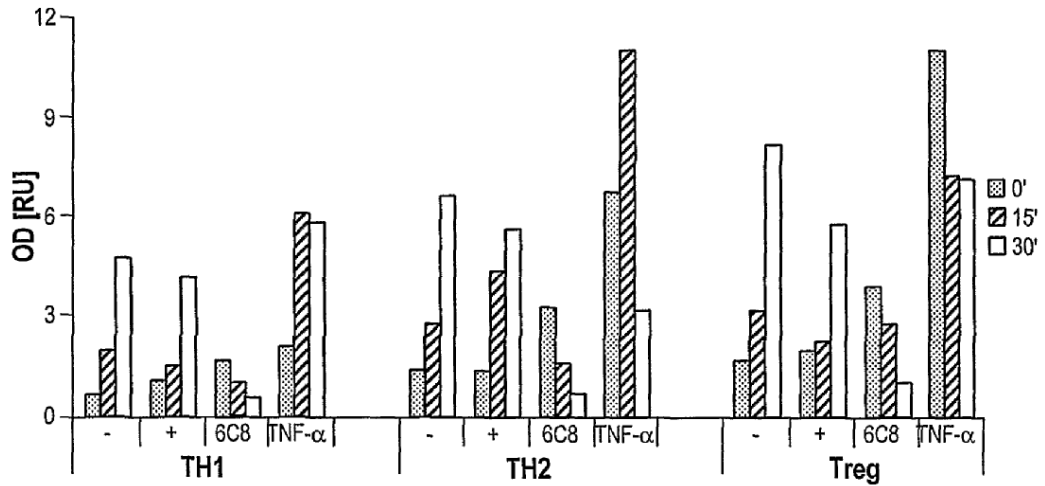


Fig. 12

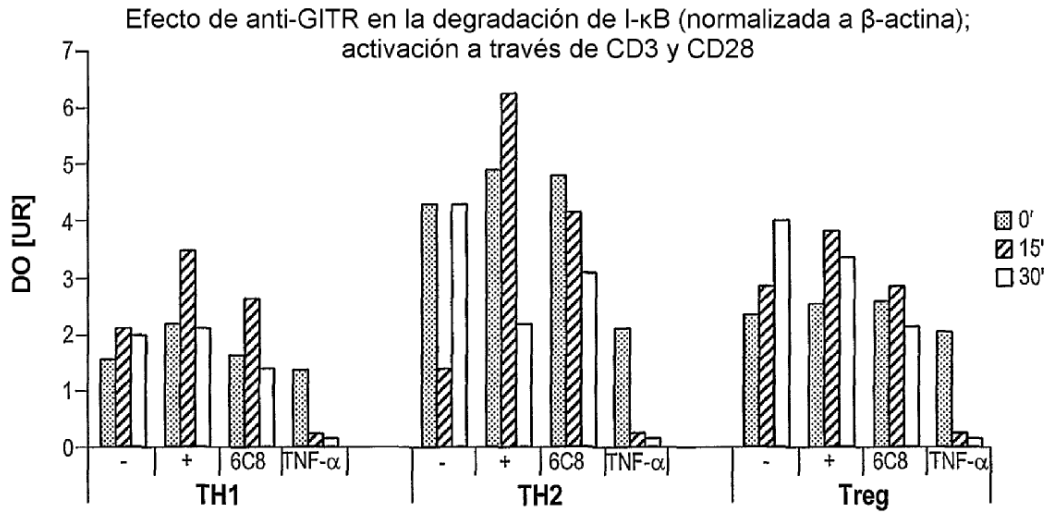


Fig. 13

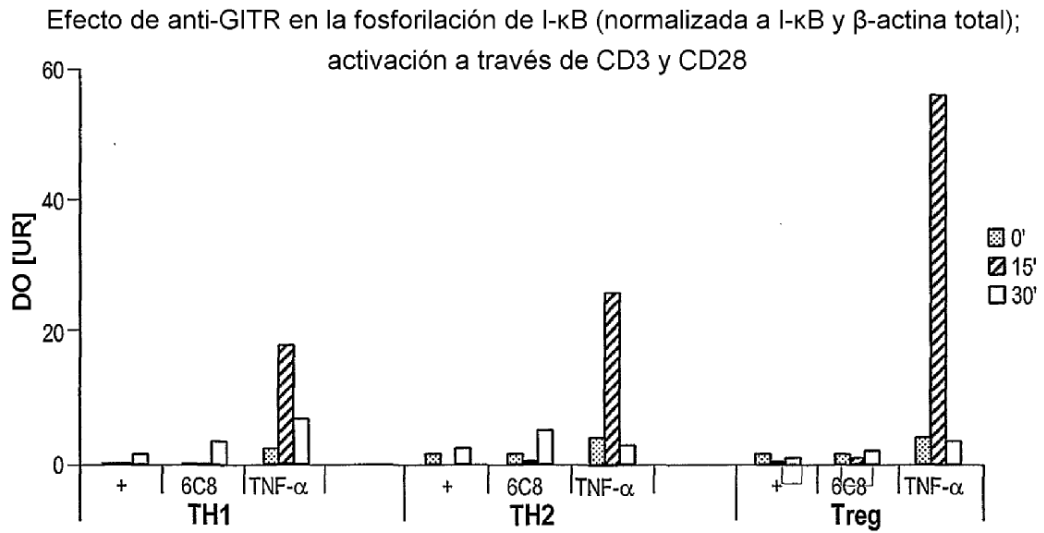


Fig. 14

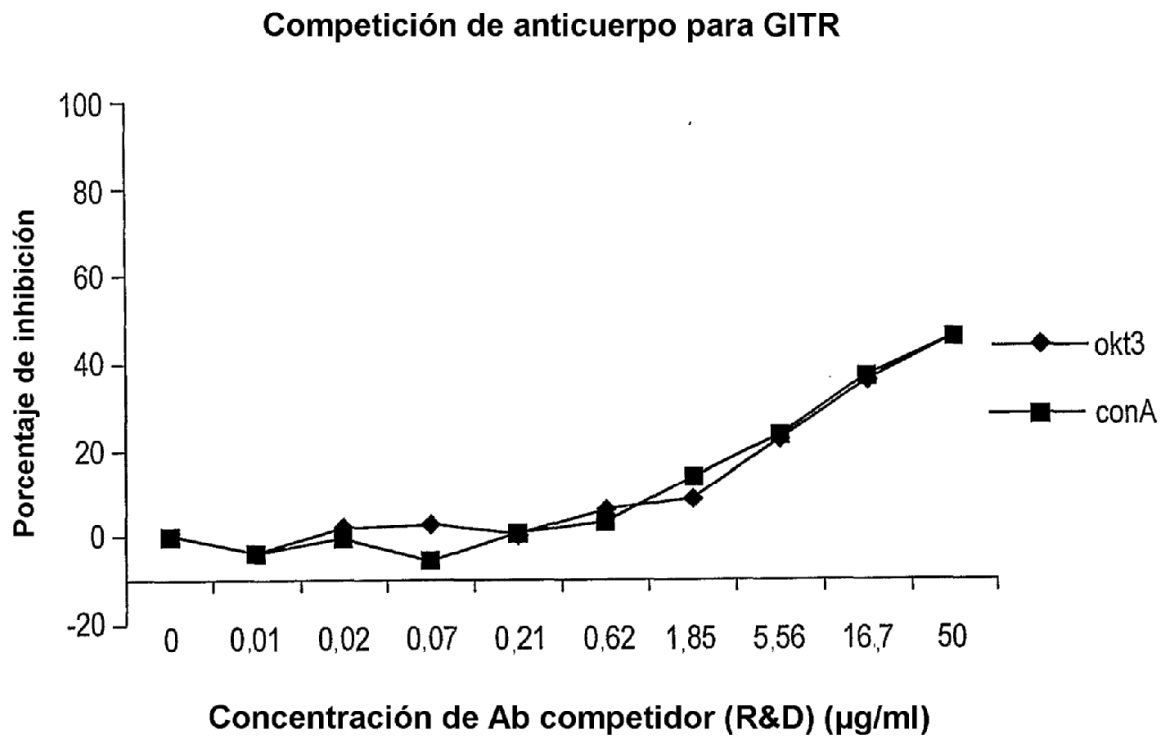


Fig. 15

Análisis cinético del anticuerpo para G1TR

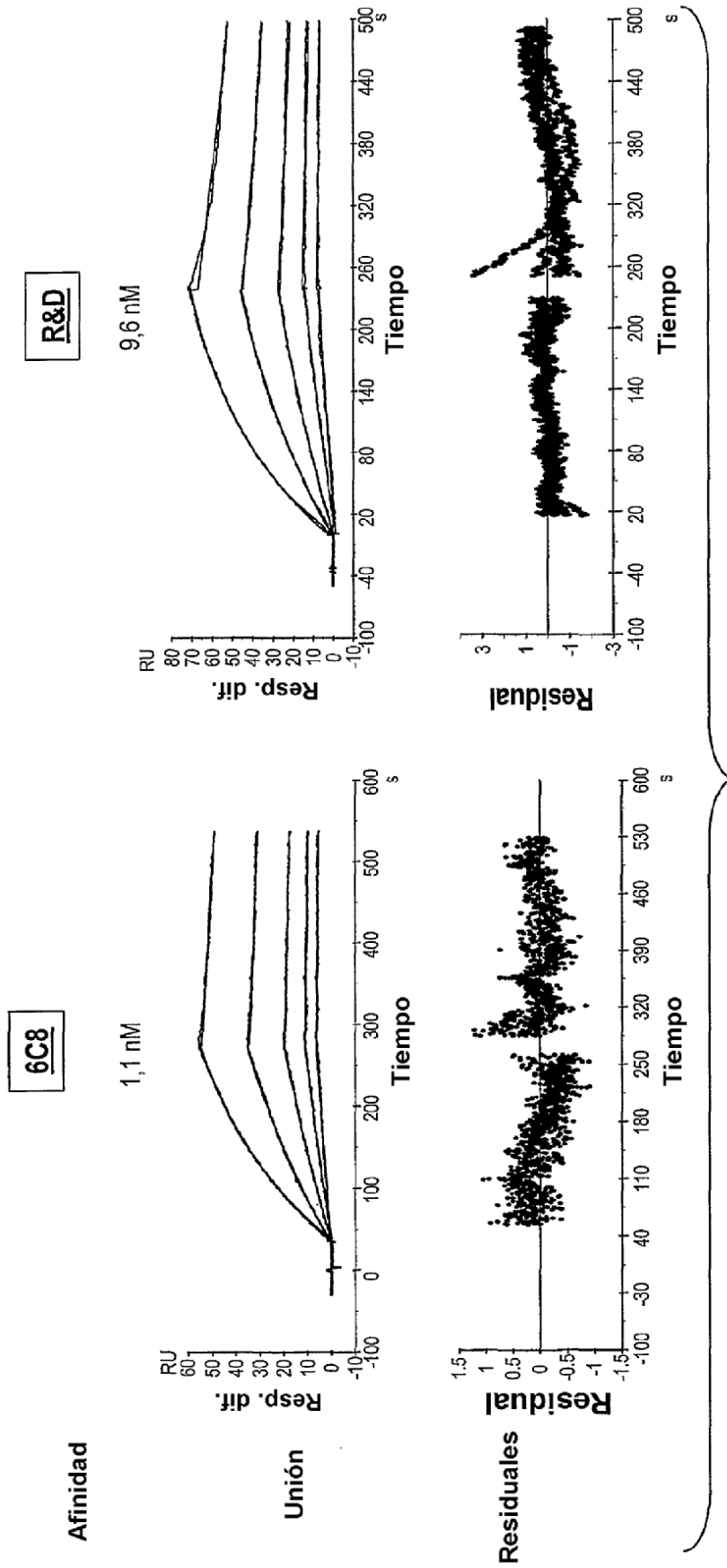


Fig. 16

Porcentaje de supervivencia de B16 tratadas con Mito C con anticuerpo

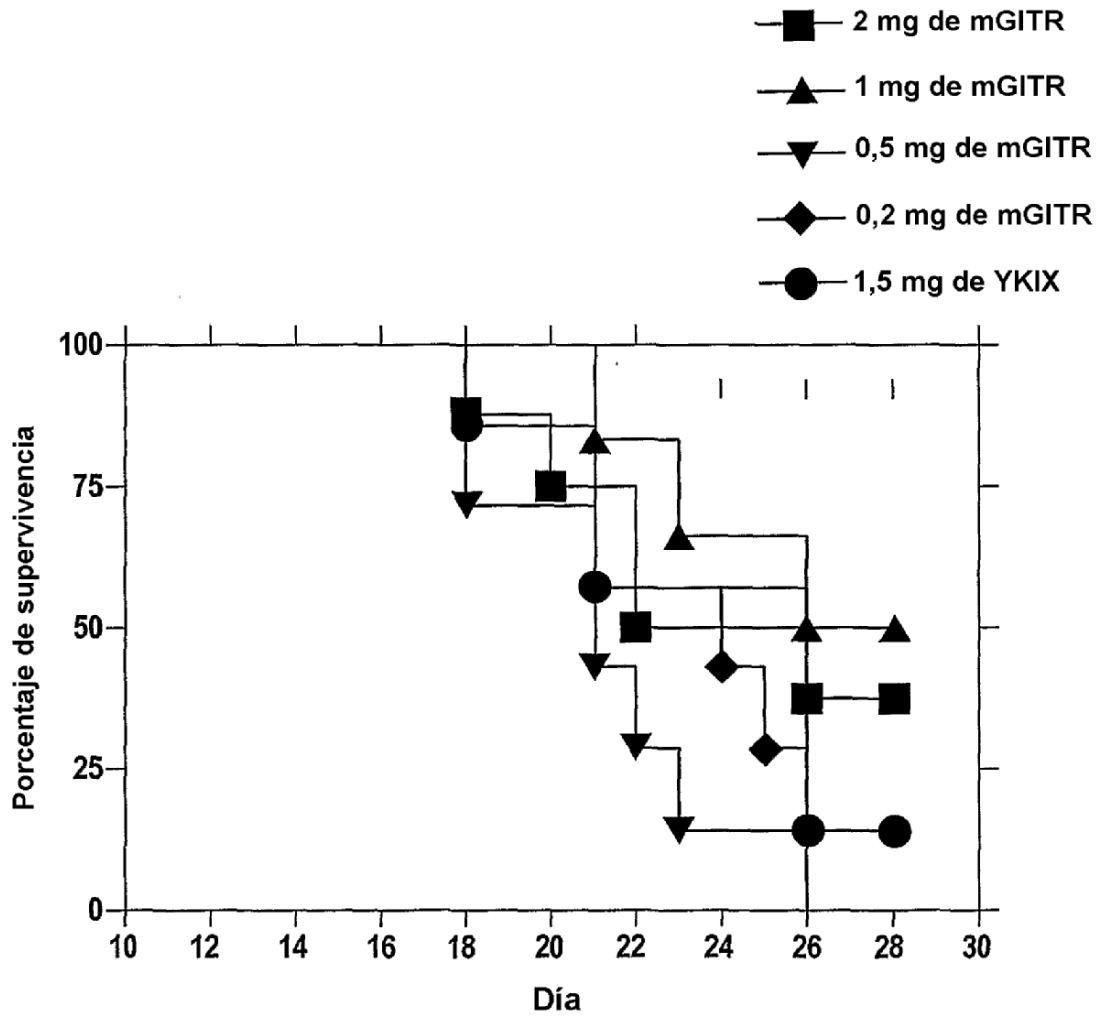


Fig. 17

6C8 VHD

A.

ATGGACAGACTTACATTCTCATTCTGCTGCTGATTGTCCCTGCA
TATGTCTTGTCCCAGTTACTCTAAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATT
GAAGCCCTCACAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGTTT
TCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTGTAGGCTGGATTTCGTCAGCCT
TCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCGCACATTTGGTGGGATGA
TGATAAGTACTATAATCCATCCCTGAAGAGCCAGCTCACAACTCTCC
AAGGATACCTCCAGAAACCAGGTATTCTCAAGATCACCAGTGTG
GACACTGCAGATGCTGCCACTTACTACTGTGCTCGAACTAGGAGG
TACTTCCCCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGGACACTAGTCACAGTC
TCCTCA

B.

MDRLTFSFLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILKPSQTLTCSFSGFSL
TSGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNPSLKSQLTISKDTS
RNQVFLKITSVDTADAATYYCARTRRYFPFAYWQGGLTVSS

6C8 VKA

C.

ATGGAGACACAGTCTCAGGTCTTTGTATACATGTTGCTGTGGTTG
TCTGGTGTTGATGGAGACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCA
TGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCC
AGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCA
GGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTAC
AGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGAT
TCACTCTCACCATCAACAATGTGCACTCTGAAGACTTGGCAGAGT
ATTTCTGTCAACAATATAACACCGATCCGCTCACGTTCCGGAGCTGG
GACCAAGCTGGAAATCAA

D.

METQSQVFVYMLLWLSGVDGDIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKA
SQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSQVDPDRFTGSGSGTDF
TLTINNVHSEDLAEYFCQQYNTDPLTFGAGTKLEIK

Fig. 18

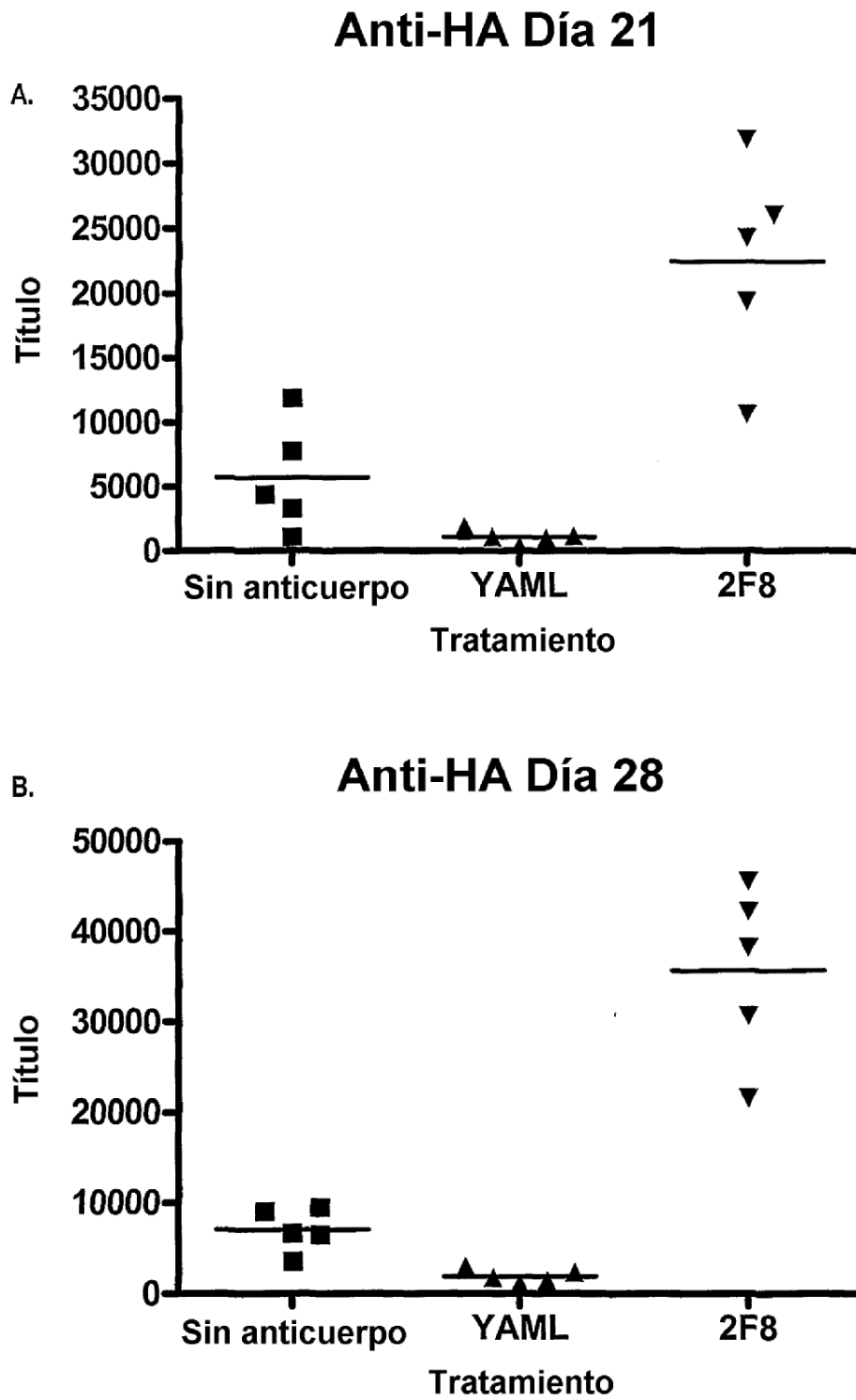


Fig. 19

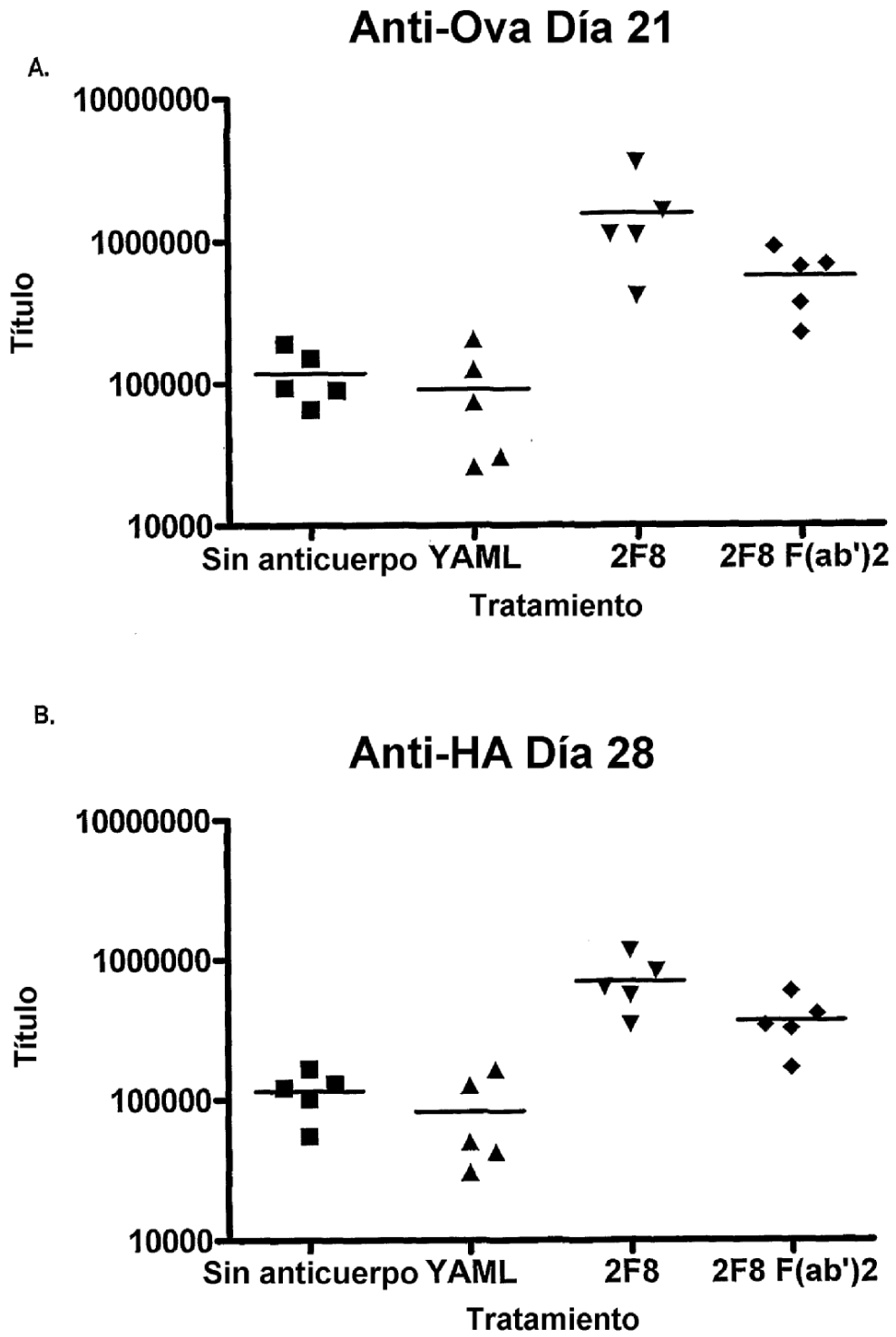


Fig. 20