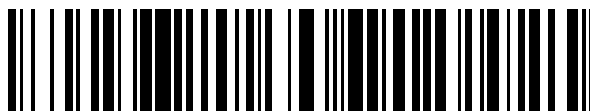


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 621**

51 Int. Cl.:

A61P 37/06 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2012 PCT/IB2012/053502**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13008171**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2012 E 12741386 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2731677**

54 Título: **Anticuerpos que se unen a OX40 y sus usos**

30 Prioridad:

11.07.2011 US 201161506491 P

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

31.05.2018

73 Titular/es:

**GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A. (100.0%)
Chemin de la Combeta, 5
2300 La Chaux-de-Fonds, CH**

72 Inventor/es:

**ATTINGER, ANTOINE;
BLEIN, STANISLAS;
BACK, JONATHAN ALBERT;
LISSILAA, RAMI y
HOU, SAMUEL**

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 670 621 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 que se unen a OX40 y sus usos

5 Solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos N.º 61/506.491, presentada el 11 de julio de 2011.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen al OX40 humano. Más específicamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y/o que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

20

Antecedentes de la invención

OX40 es un miembro de la superfamilia de receptores de TNFR y se identificó por primera vez en 1987 como una glucoproteína de 50 kDa expresada en linfocitos T CD4+ activados de la rata (Paterson DJ et al., (1987) Mol. Immunol. 24: 1281-90). El dominio de unión al ligando extracelular de OX40 está compuesto por 3 dominios ricos en cisteína completos (CRD) y un cuarto CRD parcial C-terminal (Bodmer JL et al., (2002) Trends Biochem. Sci. 27: 19-26). El ligando para OX40 es OX40L (CD252) y 3 copias de OX40 se unen al ligando trimérico para formar el complejo OX40-OX40L (Compaan DM & Hymowitz SG (2006) Structure, 14: 1321-1330). OX40 es un receptor unido a membrana; sin embargo, también se ha detectado una isoforma soluble (Taylor L & Schwarz H (2001) J. Immunol. Methods, 255: 67-72). A diferencia de CD28, OX40 no se expresa de manera constitutiva en los linfocitos T sin tratar, sino que se induce después del acoplamiento del receptor de linfocitos T (TCR). OX40 es una molécula coestimuladora secundaria, expresada después de 24 a 72 horas tras la activación; su ligando, OX40L, tampoco se expresa en las células presentadoras de antígenos en reposo, sino que va seguido de su activación. El OX40 se expresa principalmente por los linfocitos T CD4+ activados y, en cierta medida, por los linfocitos T CD8+ activados (Salek-Ardakani S et al., (2006) Curr. Immunol. Rev. 2: 37-53).

Los anticuerpos que se unen específicamente a OX40 (CD 134) se han descrito en el documento WO2007/062245. Se han descrito anticuerpos anti-OX40 adicionales que presentan Kd de aproximadamente 30 pM, véase, por ejemplo, el documento WO2010/096418, y se ha descrito un anticuerpo OX40 monoclonal que presenta Kd de aproximadamente 1 nM y que reconoce OX40 en la superficie de células humanas, de mono rhesus y cynomolgus en el documento WO2008/106116.

40

Resumen de la invención

45 La presente descripción se refiere en general a anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen a OX40 humano, a métodos para su preparación y su uso, incluyendo métodos para tratar trastornos mediados por OX40. Los anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos de la presente invención que se unen al OX40 humano son anticuerpos antagonistas y no muestran efectos agonistas y/o activan el OX40 humano en la unión.

50 En un aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y/o que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

55

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una región marco variable de cadena pesada que es el producto o derivado de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en: IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19), IGHV2-70*01 (SEQ ID NO: 20), IGHV2-70*13 (SEQ ID NO: 21), IGHV2-5*09 (SEQ ID NO: 22), e IGHV2-70*11 (SEQ ID NO: 23).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, y en el que la región marco variable de cadena pesada comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco variable de cadena pesada correspondiente del anticuerpo murino correspondiente.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una región marco variable de cadena ligera que es el producto o derivado de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en: IGHV3-11*01 (SEQ ID NO: 24), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) e IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que comprende una región marco variable de cadena ligera que es el producto o derivado del gen humano IGHV3-11*01 (SEQ ID NO: 24), y en el que la región marco variable de cadena ligera comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco correspondiente de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino correspondiente.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 y 49.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende:

- 35 (a) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 o 38; y
- (b) una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 58, 59, 79 y 80. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 60, 86, 87 y 89.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende:

- 50 (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 o 59; y
- (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano, en el que el anticuerpo comprende una región Fc de IgG4 humana, en el que el anticuerpo no tiene actividad de citotoxicidad mediada por Fc. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano, en el que el anticuerpo comprende una región Fc de IGHG1 humana, en el que el anticuerpo es competente para mecanismos de citotoxicidad tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). En un aspecto preferido, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano tiene una región Fc de IGHG1 no fucosilada y presenta

mecanismos de citotoxicidad mediados por Fc potenciados tal como ADCC.

En otro aspecto, la descripción de la presente invención también describe anticuerpos humanizados antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen con una afinidad similar al OX40 humano como el anticuerpo quimérico correspondiente, por ejemplo, retienen al menos el 75% de la afinidad de unión a OX40 (K_D) del anticuerpo quimérico correspondiente, o tienen al menos una afinidad de unión a OX40 (K_D) equivalente o mayor en comparación con el anticuerpo quimérico correspondiente. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a un epítipo dentro del segundo dominio de la región extracelular OX40 humana.

10

La descripción de la presente invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen a OX40 humano, vectores y células huésped que comprenden el ácido nucleico o el vector. También se proporcionan composiciones que comprenden el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo y un vehículo e inmunocombinados farmacéuticamente aceptables que comprenden el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo unido a un agente terapéutico.

15

La presente divulgación también proporciona métodos para tratar trastornos mediados por OX40. En un aspecto, en un modelo *in vitro* de activación y proliferación de linfocitos T alorreactivos (reacción de linfocitos mixtos, MLR), un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo inhibe eficazmente la MLR en dos individuos diferentes (respondedores), con un valor de CE_{50} de aproximadamente 100 ng/ml. Además, en una reacción xenogénica de injerto contra huésped, un modelo de enfermedad alogénica de injerto contra huésped (GVHD) observado después del trasplante de médula ósea en pacientes humanos, un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo reprimió potently la reacción de GVHD.

25 La presente descripción también proporciona kits y artículos de fabricación que comprenden el anticuerpo o fragmentos del mismo, una composición o un inmunocombinado para el tratamiento de un trastorno mediado por OX40.

Breve descripción de las figuras

30

Figura 1: (A) ELISA de unión directa sobre OX40-his humano recombinante inmovilizado. La unión de los anticuerpos quiméricos 2F8 y 1D4 en OX40 humano se midió mediante ELISA directo. Diversas concentraciones (que variaban de 10 a 0,01 mg/ml) de 1D4 (histogramas negros) y 2F8 (histogramas blancos) se incubaron con 2 mg/ml de proteína etiquetada OX40-his humana recombinante recubierta durante una noche a 4 °C en una placa de 96 pocillos. La unión de cada anticuerpo a OX40 se detectó por anticuerpo antihumano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). **(B) ELISA competitivo en OX40-Fc humano recombinante inmovilizado.** Los efectos inhibidores de 1D4 y 2F8 quiméricos en la interacción OX40/OX40L se evaluaron mediante ELISA de bloqueo. Diversas concentraciones (que variaban de 10 a 0,01 mg/ml) de 1D4 (histogramas negros) y 2F8 (histogramas blancos) se incubaron con 2 mg/ml de proteína etiquetada OX40-Fc humana recombinante recubierta durante una noche a 4 °C en una placa de 96 pocillos. Después de cinco minutos, se añadió a cada pocillo una concentración fija de OX40L humano recombinante biotinilado (0,04 mg/ml) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La unión de OX40L a OX40 se detectó usando Estreptavidina-HRP.

35

40

Figura 2: Reacción linfocítica mixta (MLR) unidireccional medida por la incorporación de 3H timidina. Las barras muestran la incorporación media de 3H -timidina (recuentos) de al menos triplicados \pm error estándar de la media. Se muestran el control de isotipo (trastuzumab) y el control positivo (efalizumab). El efector representa solo células efectoras. El efector + diana representa una medida en la que se han omitido anticuerpos.

45

Figura 3: Análisis de citometría de flujo del anticuerpo 1D4 quimérico

50

(A) Tinción en células mononucleares de sangre periférica activadas humanas (PBMC) y células HPB-ALL. Los gráficos de histograma muestran la intensidad de fluorescencia (eje X) y el número relativo de células (% de eventos máximos - Eje Y). Se indica el tipo de células teñidas. Las PBMC humanas se activaron con PHA e IL-2 durante 48 horas antes de las mediciones.

55

(B) Tinción en PBMC de mono cynomolgus activadas. La unión del anticuerpo 1D4 quimérico a OX40 cynomolgus se evaluó mediante citometría de flujo. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de sangre completa recogida de un mono cynomolgus y se cultivaron 3×10^6 células durante 50 horas en presencia de 10 mg/ml de PHA y 100 U/ml de rhuIL-2. Se incubaron las PBMC activadas con 25 mg/ml de anticuerpo de control (perfil superior (i)) o

anticuerpo OX40 antihumano de oveja biotinilado (perfil medio (ii)) o anticuerpo 1D4 quimérico biotinilado (perfil inferior (iii)). La unión de cada anticuerpo a OX40 cynomolgus se detectó con estreptavidina-APC.

- 5 **Figura 4: Mediciones de resonancia de plasmón superficial de anticuerpos anti-OX40.** Los datos se expresan como el número de respuestas (abreviado RU, eje Y) frente al tiempo (eje X).
 Figura 4A - Anticuerpo VH1/VL1 frente a quimera 1D4.
 Figura 4B - Anticuerpos humanizados basados en VH1, VH2, y VH3 (según se indica) frente a quimera 1D4.
 10 Figura 4C - ejemplos de enlazadores malos: VH4/VL4, VH5/VL4, VH5/VL5, y VH5/VL6.
 Figura 4D - ejemplos de enlazadores débiles (VH5/VL9 y VH4/VL9) y enlazadores buenos (VH6/VL9 y VH7/VL9).
 Figura 4E - anticuerpos humanizados basados en VH7.
 Figura 4F - VH6/VL9 tiene mejores propiedades de unión sobre la quimera 1D4 y la variante humanizada VH7/VL9.
- 15 **Figura 5: Alineamiento de secuencias.** Alineación de la región variable de cadena pesada (figura 5A) o cadena ligera (figura 5B) de 1D4 con marcos de línea germinal seleccionados (IGHV 2-70*10 (SEQ ID NO: 19) e IGHV3-11*01 (SEQ ID NO: 24)) de IMGT y variantes de región variable con retromutación (VH1 (SEQ ID NO: 29), VH2 (SEQ ID NO: 77), VH3 (SEQ ID NO: 78), VH4 (SEQ ID NO: 79), VH5 (SEQ ID NO: 80), VH6 (SEQ ID NO: 58), VH7 (SEQ ID NO: 59), VL1 (SEQ ID NO: 30), VL2 (SEQ ID NO: 81), VL3 (SEQ ID NO: 82), VL4 (SEQ ID NO: 83), VL5 (SEQ ID NO: 84), VL6 (SEQ ID NO: 85), VL7 (SEQ ID NO: 86), VL8 (SEQ ID NO: 87), VL9 (SEQ ID NO: 60), VL10 (SEQ ID NO: 88), VL11 (SEQ ID NO: 89)).
- 20 **Figura 6: Mediciones de termoestabilidad del fragmento FAB VH6/VL9 anti-anticuerpo anti-OX40 humanizado usando calorimetría diferencial de barrido.** Los datos se expresan como capacidad calorífica molar en exceso (abreviado Cp [kcal/mol/°C], eje Y) frente a la temperatura (eje X).
- 25 **Figura 7: Caracterización del epítipo.** Esta figura muestra el epítipo VH6/VL9 anti-anticuerpo anti-OX40 humanizado basado en los resultados del ensayo ELISA como se describe en el Ejemplo 7.
- 30 **Figura 8: Reacción linfocítica mixta (MLR) medida por la incorporación de ³H timidina.** Las figuras 8A y 8B muestran los resultados de la reacción de linfocitos mixtos de dos donantes no relacionados. La proliferación se midió por incorporación de ³H-timidina. Los gráficos muestran los valores de recuentos absolutos para cada condición ± SEM. Las células respondedoras eran PBMC no tratadas, las células estimuladoras eran PBMC tratadas con mitomicina. Todas las condiciones con anticuerpos de ensayo se realizaron con células respondedoras mezcladas con PBMC estimuladoras heterólogas. El control positivo era Efalizumab (anticuerpo anti LFA-1).
- 35 **Figura 9: Modelo de reacción xenogénica de injerto contra huésped.** Esta figura muestra el porcentaje de supervivencia dentro de los grupos de ocho animales por cada condición mencionada. Vehículo: solo PBS. La línea de puntos vertical indica el último día de tratamiento. No se observó mortalidad ni ningún síntoma en un grupo de dos animales de control irradiados que no recibieron PBMC (no se muestra).

Descripción detallada de la invención

40 La presente descripción se refiere a anticuerpos antagonistas y fragmentos de los mismos que se unen al OX40 humano.

45 El término "OX40 humano" como se usa en el presente documento incluye variantes, isoformas y homólogos de especies de OX40 humano. Por consiguiente, los anticuerpos de esta descripción pueden, en ciertos casos, reaccionar de forma cruzada con OX40 de especies distintas de la humana. En ciertas realizaciones, los anticuerpos pueden ser completamente específicos para una o más proteínas OX40 humanas y pueden no presentar especies u otros tipos de reactividad cruzada no humana. La secuencia de aminoácidos completa de un OX40 humano ejemplar tiene el número de acceso de Swiss-Prot P43489 (TNR4_HUMAN; SEQ ID NO: 12). OX40 también se conoce como 50 CD134, TNFRSF4, ACT35 o TXGP1 L. El OX40 humano se designa GenID: 7293 por Entrez Gene, y HGNC: 11918 por HGNC. OX40 también se ha designado CD134 (grupo de diferenciación 134). OX40 puede codificarse por el gen designado TNFRSF4/OX40.

55 El uso de "OX40 humano" en el presente documento incluye todos los alelos conocidos y aún no descubiertos y las formas polimórficas del OX40 humano. Los términos "OX40 humano", "OX40" o "Receptor OX40" se usan en el presente documento de manera equivalente y significan "OX40 humano" si no se indica específicamente de otra manera.

El término "ligando OX40" u "OX40L" se usan en el presente documento de manera equivalente e incluyen el ligando

OX40, específicamente el ligando OX40 humano. OX40L es un miembro de la superfamilia TNF y también se conoce como gp34 o CD252. OX40L también se ha designado CD252 (grupo de diferenciación 252) y tiene el número de acceso a la base de datos de secuencias P23510 (Swiss-Prot) o Q6FGS4 (Uniprot). OX40L se expresa en la superficie de los linfocitos B activados, los linfocitos T, las células dendríticas y las células endoteliales.

5 El término "anticuerpo o fragmento del mismo que se une al OX40 humano" como se usa en el presente documento incluye anticuerpos o un fragmento de los mismos que se unen al OX40 humano, por ejemplo, OX40 humano en forma aislada, con una afinidad (K_D) de 500 nM o menos, preferiblemente 200 nM o menos, más preferiblemente 150 nM o menos, más preferiblemente 120 nM o menos, incluso más preferiblemente 110 nM o menos. El término
10 "anticuerpo o fragmento del mismo que se une al OX40 humano" incluye anticuerpos o fragmentos de unión antigénicos del mismo.

Los términos "anticuerpo antagonístico" o "anticuerpo antagonista" se usan en el presente documento de forma equivalente e incluyen un anticuerpo que es capaz de inhibir y/o neutralizar la actividad de señalización biológica de
15 OX40, por ejemplo, bloqueando la unión o reduciendo sustancialmente la unión de OX40 al ligando OX40 y, por lo tanto, inhibiendo o reduciendo la ruta de señalización desencadenada por OX40 y/o inhibiendo o reduciendo una respuesta celular mediada por OX40 como la proliferación de linfocitos, la expresión de citocinas o la supervivencia de linfocitos.

20 El término "anticuerpo" como se denomina en el presente documento incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno o cadenas sencillas de los mismos. Un "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de
25 cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR) con secuencias hipervariables y/o implicadas en el reconocimiento de antígenos y/o
30 usualmente forman bucles estructuralmente definidos, intercalados con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR o FW). Cada VH y VL está compuesto por tres CDR y cuatro FW, dispuestos desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. Las secuencias de aminoácidos de FW1, FW2, FW3 y FW4 constituyen juntas la "región no CDR" o "región CDR no extendida" de VH o VL como se hace referencia en el presente documento.

35 El término "región marco variable de cadena pesada" como se hace referencia en el presente documento puede comprender una o más (por ejemplo, una, dos, tres y/o cuatro) secuencias de la región marco de cadena pesada (por ejemplo, marco 1 (FW1), marco 2 (FW2), marco 3 (FW3) y/o marco 4 (FW4)). Preferiblemente, la estructura de región variable de cadena pesada comprende FW1, FW2 y/o FW3, más preferiblemente FW1, FW2 y FW3. El
40 término "región marco variable de cadena ligera" como se hace referencia en el presente documento puede comprender una o más (por ejemplo, una, dos, tres y/o cuatro) secuencias de la región marco de cadena ligera (por ejemplo, marco 1 (FW1), marco 2 (FW2), marco 3 (FW3) y/o marco 4 (FW4)). Preferiblemente, la estructura de región variable de cadena ligera comprende FW1, FW2 y/o FW3, más preferiblemente FW1, FW2 y FW3.

45 Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores huésped, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el Primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

50 Los anticuerpos se agrupan en clases, también denominadas isotipos, según se determina genéticamente por la región constante. Las cadenas ligeras constantes humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa (CK) y lambda (CA). Las cadenas pesadas se clasifican como mu (μ), delta (δ), gamma (γ), alfa (α) o épsilon (ϵ), y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Por lo tanto, "isotipo" como se usa en el presente documento se refiere a cualquiera de las clases y/o subclases de inmunoglobulinas definidas por las características
55 químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulina humana conocidos son IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD), e IgE (IGHE). El denominado gen IGHGP pseudo-gamma de inmunoglobulina humana representa un gen de la región constante pesada de inmunoglobulina humana adicional que se ha secuenciado pero no codifica una proteína debido a una región de cambio alterada (Bensmana M et al., (1988) Nucleic Acids Res. 16(7): 3108). A pesar de

tener una región de cambio alterada, el gen IGHGP pseudo-gamma de inmunoglobulina humana tiene marcos de lectura abiertos para todos los dominios constantes pesados (CH1-CH3) y bisagra. Todos los marcos de lectura abiertos para sus dominios constantes pesados codifican dominios de proteína que se alinean bien con todos los dominios constantes de inmunoglobulina humana con las características estructurales previstas. Este isotipo pseudo-gamma adicional se denomina en el presente documento IgGP o IGHGP. Se han informado otros genes de pseudo-inmunoglobulina tales como los pseudogenes épsilon P1 y P2 de dominio constante pesado de inmunoglobulina humana (IGHEP1 e IGHEP2). La clase IgG es la más comúnmente utilizada con fines terapéuticos. En seres humanos, esta clase comprende las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En ratones, esta clase comprende las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3.

10

El término "anticuerpo quimérico" como se usa en el presente documento incluye anticuerpos en los que las secuencias de región variable se derivan de una especie y las secuencias de región constante se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las secuencias de región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de región constante se derivan de un anticuerpo humano.

15

El término "anticuerpo humanizado" o "anticuerpo anti-OX40 humanizado" como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas. Se pueden realizar modificaciones de la región marco adicionales dentro de las secuencias marco humanas, así como dentro de las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero.

20

El término "Fab" o "región Fab" como se usa en el presente documento incluye los polipéptidos que comprenden los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, VL y CL. Fab puede referirse a esta región en aislamiento, o esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa o fragmento de anticuerpo.

25

El término "Fc" o "región Fc", como se usa en el presente documento, incluye el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo que excluye el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante. Por lo tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, y los últimos tres dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y la bisagra flexible N-terminal a estos dominios.

30

Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios de inmunoglobulina C gamma 2 y C gamma 3 (Cy2 y Cy3) y la bisagra entre C gamma 1 (Cy1) y C gamma 2 (Cy2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define habitualmente comprendiendo los residuos C226 o P230 con respecto a su extremo carboxilo, en donde la numeración es según el sistema de numeración de EU. Para la IgG1 humana, la región Fc se define en el presente documento para comprender el

35

residuo P232 con respecto a su extremo carboxilo, en donde la numeración es según el sistema de numeración de EU (Edelman GM et al., (1969) Proc Natl Acad Sci USA, 63(1): 78-85). Fc puede referirse a esta región en aislamiento o esta región en el contexto de un polipéptido Fc, por ejemplo un anticuerpo.

40

El término "bisagra" o "región bisagra" o "región bisagra de anticuerpo" en el presente documento incluye el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre los dominios constantes primero y segundo de un anticuerpo. La "región bisagra" a la que se hace referencia en el presente documento es una región de secuencia de 6-62 aminoácidos de longitud, solo presente en IgA, IgD e IgG, que incluye los residuos de cisteína que unen las dos cadenas pesadas. Estructuralmente, el dominio CH1 de IgG termina en la posición EU 220, y el dominio CH2 de IgG comienza en la posición UE del residuo 237. Por lo tanto, para la IgG, la bisagra del anticuerpo se define en el

45

presente documento para incluir las posiciones 221 (D221 en IgG1) a 231 (A231 en IgG1), en donde la numeración es según el sistema de numeración de EU (Edelman GM *et al.*, anteriormente).

50

El término "anticuerpo parental" o "inmunoglobulina parental" como se usa en el presente documento, incluye un anticuerpo no modificado que se modifica posteriormente para generar una variante. Dicho anticuerpo parental puede ser un anticuerpo de origen natural, o una versión variante o modificada de un anticuerpo de origen natural. El anticuerpo parental puede referirse al propio anticuerpo, las composiciones que comprenden el anticuerpo parental, o la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Por "anticuerpo anti-OX40 parental" como se usa en el presente documento se entiende un anticuerpo o inmunoglobulina que se une al OX40 humano y se modifica para generar una variante. Por "anticuerpo murino correspondiente" como se usa en el presente documento se refiere a un

55

anticuerpo murino o inmunoglobulina que se une al OX40 humano y que puede modificarse para generar una variante, específicamente el anticuerpo murino 1D4 como se describe en el presente documento.

El término "anticuerpo variante" o "variante de anticuerpo" como se usa en el presente documento incluye una secuencia de anticuerpo que difiere de la de una secuencia de anticuerpo parental en virtud de al menos una

modificación aminoacídica en comparación con el parental. La secuencia de anticuerpo variante en el presente documento poseerá preferiblemente al menos aproximadamente un 80%, mucho más preferiblemente al menos aproximadamente un 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de anticuerpo parental. La variante de anticuerpo puede referirse al propio anticuerpo, las composiciones que comprenden la variante de anticuerpo, o la secuencia de aminoácidos que la codifica.

El término "modificación aminoacídica" en el presente documento incluye una sustitución, inserción y/o delección de aminoácidos en una secuencia polipeptídica. Por "sustitución aminoacídica" o "sustitución" en el presente documento se refiere al reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica parental con otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución R94K se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante de la región marco variable de cadena pesada, en la que la arginina en la posición 94 se reemplaza por una lisina. Para el ejemplo anterior, 94K indica la sustitución de la posición 94 por una lisina. Para los fines del presente documento, las sustituciones múltiples están típicamente separadas por una barra. Por ejemplo, R94K/L78V se refiere a una variante doble que comprende las sustituciones R94K y L78V. Por "inserción de aminoácido" o "inserción" como se usa en el presente documento, se refiere a la adición de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica parental. Por ejemplo, la inserción -94 designa una inserción en la posición 94. Por "delección de aminoácido" o "eliminación" como se usa en el presente documento se refiere a la eliminación de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica parental. Por ejemplo, R94- designa la eliminación de arginina en la posición 94.

Como se usa en el presente documento, la expresión "modificaciones conservativas" o "modificaciones de secuencia conservativas" pretende referirse a modificaciones aminoacídicas que no afectan significativamente o alteran las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservativas incluyen sustituciones, inserciones y delecciones de aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo de la invención mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagénesis de sitio dirigido y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con 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, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR o dentro de las regiones marco de un anticuerpo de la invención pueden reemplazarse con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y el anticuerpo alterado (anticuerpo variante) puede probarse para determinar la función conservada.

Para todos los dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina humana, la numeración está según el "sistema de numeración de EU" (Edelman GM et al., (1969) Proc Natl Acad Sci USA, 63(1): 78-85). Para el dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina kappa humana (IGKC), la numeración está según el "sistema de numeración de EU" (Edelman GM *et al.*, anteriormente).

Para los dominios constantes de cadena ligera de inmunoglobulina lambda humana (IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6, e IGLC7), la numeración es según el "sistema de numeración de Kabat" (Kabat EA et al., (1991) Sequences of proteins of immunological interest. 5ª Edición - US Department of Health and Human Services, publicación NIH n.º 91-3242) como se describe por Dariavach P et al., (1987) Proc Natl Acad Sci USA, 84(24): 9074-8 y Frangione B et al., (1985) Proc Natl Acad Sci USA, 82(10): 3415-9.

El término "dominio variable" se refiere a los dominios que media la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para un antígeno particular. En los anticuerpos de origen natural, el sitio de unión al antígeno consiste en dos dominios variables que definen la especificidad: uno ubicado en la cadena pesada (VH) y el otro ubicado en la cadena ligera (VL). En algunos casos, la especificidad puede residir exclusivamente en solo uno de los dos dominios como en los anticuerpos de dominio único de anticuerpos de cadena pesada que se encuentran en los camélidos. Las regiones V son usualmente de aproximadamente 110 aminoácidos de largo, y consisten en tramos relativamente invariantes de secuencia de aminoácidos que se denominan regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que son de 9-12 aminoácidos de largo. Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cuatro

FR, adoptando en gran medida una configuración de hoja de tiempo, conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas muy cerca por las FR, y con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat EA *et al.*, anteriormente). El término "región hipervariable" como se usa en el presente documento se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable generalmente comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR", siendo la última de mayor variabilidad de secuencia y/o estando implicada en el reconocimiento de antígeno. Para todos los dominios variables, la numeración está según Kabat (Kabat EA *et al.*, anteriormente).

10

Se usan varias definiciones de CDR y se incluyen en el presente documento. La definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia y es la más comúnmente utilizada (Kabat EA *et al.*, anteriormente). Chothia se refiere en cambio a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia C & Lesk AM (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917). La definición de AbM es un compromiso entre las definiciones de Kabat y Chothia y se usa por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (Martin ACR *et al.*, (1989) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86: 9268-72; Martin ACR *et al.*, (1991) *Methods Enzymol.* 203: 121-153; Pedersen JT *et al.*, (1992) *Immunomethods*, 1: 126-136; Rees AR *et al.*, (1996) en Sternberg M.J.E. (ed.), *Protein Structure Prediction*. Oxford University Press, Oxford, 141-172). La definición de contacto se ha introducido recientemente (MacCallum RM *et al.*, (1996) *J. Mol. Biol.* 262: 732-745) y se basa en un análisis de las estructuras complejas disponibles, que están disponibles en Protein Databank. La definición de la CDR por IMGT®, el internacional ImMunoGeneTics information system® (<http://www.imgt.org>) se basa en la numeración de IMGT para todas las REGIONES V del receptor de inmunoglobulinas y de linfocitos T de todas las especies (IMGT®, el internacional ImMunoGeneTics information system®; Lefranc MP *et al.*, (1991) *Nucleic Acids Res.* 27(1): 209-12; Ruiz M *et al.*, (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1): 219-21; Lefranc MP (2001) *Nucleic Acids Res.* 29(1): 207-9; Lefranc MP (2003) *Nucleic Acids Res.* 31(1): 307-10; Lefranc MP *et al.*, (2005) *Dev. Comp. Immunol.* 29(3): 185-203; Kaas Q *et al.*, (2007) *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 6(4): 253-64).

Todas las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) analizadas en la presente invención, se definen preferiblemente de según el IMGT®. Los residuos del dominio variable para cada una de estas CDR son los siguientes (numeración según Kabat EA, *et al.*, anteriormente): CDR1: 27-32, LCDR2: 50-52, LCDR3: 89-97, CDR1: 26-35, HCDR2: 51-57 y HCDR3: 93-102. La "región no CDR" de la región VL como se usa en el presente documento comprende las secuencias de aminoácidos: 1-26 (FR1), 33-49 (FR2), 53-88 (FR3), y 98- aproximadamente 107 (FR4). La "región no CDR" de la región VH como se usa en el presente documento comprende las secuencias de aminoácidos: 1-25 (FR1), 36-50 (FR2), 58-92 (FR3), y 103- aproximadamente 113 (FR4).

Las CDR de la presente invención pueden comprender "CDR extendidas" que se basan en las definiciones mencionadas anteriormente y tienen residuos de dominio variable como se indica a continuación: CDR1: 24-36, LCDR2: 46-56, LCDR3:89-97, HCDR1: 26-36, HCDR2:47-65, HCDR3: 93-102. Estas CDR extendidas también se numeran según Kabat *et al.*, anteriormente. La "región CDR no extendida" de la región VL como se usa en el presente documento comprende las secuencias de aminoácidos: 1-23 (FR1), 37-45 (FR2), 57-88 (FR3), y 98- aproximadamente 107 (FR4). La "región CDR no extendida" de la región VH como se usa en el presente documento comprende las secuencias de aminoácidos: 1-25 (FR1), 37-46 (FR2), 66-92 (FR3), y 103- aproximadamente 113 (FR4).

El término "anticuerpo de longitud completa", como se usa en el presente documento, incluye la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluyendo regiones variables y constantes. Por ejemplo, en la mayoría de los mamíferos, incluidos los seres humanos y los ratones, el anticuerpo de longitud completa de la clase IgG es un tetrámero y consiste en dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulina, teniendo cada par una cadena ligera y una cadena pesada, comprendiendo cada cadena ligera los dominios de inmunoglobulina VL y CL, y comprendiendo cada cadena pesada los dominios de inmunoglobulina VH, CH1 (Cy1), CH2 (Cy2) y CH3 (Cy3). En algunos mamíferos, por ejemplo, en camellos y llamas, los anticuerpos IgG pueden consistir en solo dos cadenas pesadas, comprendiendo cada cadena pesada un dominio variable unido a la región Fc.

Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, incluyendo Fab' y Fab'-SH, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward ES *et al.*, (1989) *Nature*, 341: 544-546) que consiste en una sola variable, (v) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos, (vi) moléculas Fv monocatenarias (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird RE *et al.*, (1988) *Science* 242: 423-426; Huston JS *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-

83), (vii) dímeros de Fv monocatenarios biespecíficos (documento PCT/US92/09965), (viii) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos por fusión génica (Tomlinson I & Hollinger P (2000) *Methods Enzymol.* 326: 461-79; documento WO94/13804; Holliger P et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-48) e (ix) scFv genéticamente condensado al mismo anticuerpo o uno diferente (Coloma MJ & Morrison SL (1997) *Nature Biotechnology*, 15(2): 159-163).

El término "función efectora" como se usa en el presente documento, incluye un evento bioquímico que es resultado de la interacción de una región Fc del anticuerpo con un receptor o ligando Fc. Las funciones efectoras incluyen funciones efectoras mediadas por FcγR tales como ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y ADCP (fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos), y funciones efectoras mediadas por complemento tales como CDC (citotoxicidad dependiente de complemento). Una función efectora de un anticuerpo puede alterarse alterando, es decir potenciando o reduciendo, preferiblemente potenciando, la afinidad del anticuerpo por una molécula efectora tal como un receptor Fc o un componente de complemento. La afinidad de unión generalmente variará modificando el sitio de unión a la molécula efectora, y en este caso, es apropiado localizar el sitio de interés y modificar al menos parte del sitio de una manera adecuada. También se prevé que una alteración en el sitio de unión en el anticuerpo para la molécula efectora no necesita alterar significativamente la afinidad global de unión, pero puede alterar la geometría de la interacción haciendo que el mecanismo efector sea ineficaz como en una unión no productiva. Se prevé además que una función efectora también se pueda alterar modificando un sitio que no esté directamente implicado en la unión a la molécula efectora, pero que esté implicado de otro modo en el rendimiento de la función efectora. Al alterar una función efectora de un anticuerpo, puede ser posible controlar diversos aspectos de la respuesta inmune, por ejemplo, potenciar o suprimir diversas reacciones del sistema inmune, con posibles efectos beneficiosos en el diagnóstico y la terapia.

Como se usa en el presente documento, el término "trastorno mediado por OX40" incluye afecciones tales como alergia, asma, EPOC, artritis reumatoide, psoriasis y enfermedades asociadas con la autoinmunidad y la inflamación.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc. Preferentemente, el sujeto es humano.

Anticuerpos anti-OX40

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y/o que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano comprende una CDR1 de cadena pesada extendida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y/o una CDR2 de cadena pesada extendida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y/o una CDR3 de cadena pesada extendida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y/o comprende una CDR1 de cadena ligera extendida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, y/o una CDR2 de cadena ligera extendida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, y/o una CDR3 de cadena ligera extendida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

Preferiblemente, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y una CDR3 de pesada cadena que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y/o una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. Más preferiblemente, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y una CDR3 de pesada cadena que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y una CDR1 de cadena ligera que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

- 5 Es bien conocido en la técnica que el dominio CDR3, independientemente de los dominios CDR1 y/o CDR2, solo puede determinar la especificidad de unión de un anticuerpo por un antígeno relacionado y que se pueden generar predeciblemente múltiples anticuerpos con la misma especificidad de unión basada en una secuencia CDR3 común. Véase, por ejemplo, Klimka A et al., (2000) Br. J. Cancer, 83(2): 252-260 (que describe la producción de un anticuerpo anti-CD30 humanizado usando solo la CDR3 de dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-
 10 CD30 murino Ki-4); Beiboer SH et al., (2000) J. Mol. Biol. 296: 833-849 (que describe anticuerpos de glucoproteína 2 epitelial recombinante (EGP-2) usando solo la secuencia CDR3 de cadena pesada del anticuerpo MOC-31 anti-EGP-2 murino parental); Rader C et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95: 8910-8915 (que describe un panel de anticuerpos $\alpha\beta 3$ anti-integrina humanizados que usan un dominio CDR3 variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo $\alpha\beta 3$ anti-integrina murino LM609 en el que cada anticuerpo miembro comprende una secuencia distinta
 15 fuera del dominio CDR3 y capaz de unir el mismo epítipo que el anticuerpo murino parental con afinidades tan altas o más altas que el anticuerpo murino parental); Barbas C et al., (1994) J. Am. Chem. Soc. 116: 2161-62 (que describe que el dominio CDR3 proporciona la contribución más significativa a la unión al antígeno).

Por consiguiente, la presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen al OX40 humano que comprende uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera, que comprenden particularmente CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y/o CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, en donde el anticuerpo es capaz de unirse al OX40 humano. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos de la invención que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo no humano (a) son capaces de competir por la unión con; (b)
 20 conservan las características funcionales; (c) se unen al mismo epítipo; y/o (d) tienen una afinidad de unión similar al anticuerpo no humano, por ejemplo, murino, parental correspondiente.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, y una secuencia de
 35 región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto, la presente invención proporciona variantes de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano. Por lo tanto, la presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen una secuencia de aminoácidos de las regiones no CDR de la secuencia de la región variable de cadena pesada y/o ligera que es al menos un 80% idéntica (que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos) a la secuencia de aminoácidos de las regiones no CDR de la secuencia de la región variable de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo antagonista parental de la cadena pesada o ligera, por ejemplo, de las secuencias de la región variable pesada y ligera como en la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 8, respectivamente. También se proporcionan por la presente invención anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen una
 45 secuencia de aminoácidos de las regiones CDR no extendidas de la secuencia de la región variable de cadena pesada y/o ligera que es al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR no extendidas de la secuencia de la región variable de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo antagonista parental de la cadena pesada o ligera. Preferiblemente, la identidad de la secuencia de aminoácidos de las regiones no CDR o de las regiones CDR no extendidas de la secuencia de la región variable de cadena pesada y/o ligera es de al
 50 menos un 85%, más preferiblemente al menos un 90%, y mucho más preferiblemente al menos un 95%, en particular un 96%, más en particular un 97%, incluso más en particular un 98%, mucho más en particular un 99%, incluyendo, por ejemplo, un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, y un 100%. La identidad u homología con respecto a una secuencia de aminoácidos se define en el presente documento como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son
 55 idénticos al anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. Por lo tanto, la identidad de secuencia puede determinarse mediante métodos estándar que se usan comúnmente para comparar la similitud en la posición de los aminoácidos de dos polipéptidos. Usando un programa informático, tal como BLAST o FASTA, dos polipéptidos se alinean para determinar la correspondencia óptima de sus respectivos

aminoácidos (ya sea a lo largo de la longitud completa de una o ambas secuencias o a lo largo de una porción predeterminada de una o ambas secuencias). Los programas proporcionan una penalización de apertura predeterminada y una penalización por hueco predeterminada, y se puede usar una matriz de puntuación tal como PAM250 (una matriz de puntuación estándar; véase Dayhoff MO et al., (1978) en Atlas of Protein Sequence and

5 Structure, vol 5, supp. 3) junto con el programa informático. Por ejemplo, el porcentaje de identidad se puede calcular como: el número total de coincidencias idénticas multiplicado por 100 y luego dividido por la suma de la longitud de la secuencia más larga dentro del intervalo combinado y el número de huecos introducidos en las secuencias más largas para alinear las dos secuencias.

10 En algunas realizaciones, por lo tanto, la presente descripción proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de región marco variable de cadena pesada que es al menos un 70 % idéntica a la secuencia de región marco de SEQ ID NOS: 19, 20, 21, 22 o 23, y/o una secuencia de región marco variable de cadena ligera que es al menos un 60 % idéntica a la secuencia de región marco de SEQ ID NOS: 24, 25, 26, 27 y 28. En algunas realizaciones, la

15 presente descripción proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de región marco variable de cadena pesada que es al menos un 74% idéntica a la secuencia de región marco de SEQ ID NO: 19, y/o una secuencia de región marco variable de cadena ligera que es al menos un 65 % idéntica a la secuencia de región marco de SEQ ID NO: 24.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende las CDR de cadena pesada y/o ligera como se ha descrito anteriormente, y que comprende además una región marco variable de cadena pesada que es el producto o derivado de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19), IGHV2-70*01 (SEQ ID NO: 20), IGHV2-70*13 (SEQ ID NO: 21), IGHV2-5*09 (SEQ ID NO: 22), e IGHV2-70*11 (SEQ ID NO: 23), preferiblemente una región marco variable de cadena pesada que es el producto o derivado del gen humano IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19). La región marco variable de cadena pesada puede comprender una o más (por ejemplo, una, dos, tres y/o cuatro) secuencias de región marco de cadena pesada (por ejemplo, marco 1 (FW1), marco 2 (FW2), marco 3 (FW3) y/o marco 4 (FW4)) presentes en el producto o derivadas de los genes humanos. Preferiblemente, el marco de la región

25 variable de cadena pesada comprende FW1, FW2 y/o FW3, más preferiblemente FW1, FW2 y FW3 presentes en el producto o derivados de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19), IGHV2-70*01 (SEQ ID NO: 20), IGHV2-70*13 (SEQ ID NO: 21), IGHV2-5*09 (SEQ ID NO: 22), e IGHV2-70*11 (SEQ ID NO: 23). Las secuencias de la región marco de cadena pesada como se usan en el presente documento incluyen FW1 (posición 1 a posición 25), FW2 (posición 36 a posición 49), FW3 (posición 66 a posición 94), y FW 4 (posición

30 103 a posición 113), en donde la posición aminoacídica se indica utilizando el sistema de numeración expuesto en Kabat.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región marco variable de cadena pesada que es el producto o

40 derivado del gen humano IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19), y en el que la región marco variable de cadena pesada comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco variable de cadena pesada correspondiente del anticuerpo murino correspondiente.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende

45 una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, y en el que la región marco variable de cadena pesada comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco variable de cadena pesada correspondiente del anticuerpo murino correspondiente.

Preferiblemente, la modificación de aminoácidos comprende una sustitución de aminoácidos en la posición

50 aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en 23, 35b, 48, 50, 60 y 62, más preferiblemente en posiciones aminoacídicas seleccionadas del grupo que consiste en 23, 35b, 50, 60 y 62, mucho más preferidas en la posición aminoacídica 35b, en donde la posición aminoacídica de cada miembro del grupo se indica según la numeración de Kabat. Específicamente, la modificación de aminoácidos comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 23S, 35bG, 48L, 50H, 60N y 62A, preferiblemente una sustitución de aminoácidos

55 seleccionada del grupo que consiste en T23S, S35bG, I48L, R50H, S60N y S62A, mientras que S35bG es la sustitución aminoacídica más preferida en la que la posición aminoacídica de cada miembro del grupo se indica según la numeración de Kabat.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al

OX40 humano que comprende una región marco variable de cadena ligera que es el producto o derivado de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) e IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28), preferiblemente una región marco variable de cadena ligera que es el producto o derivado del gen humano IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24). La región marco de región variable de cadena ligera puede comprender una o más (por ejemplo, una, dos, tres y/o cuatro) secuencias de región marco de cadena ligera (por ejemplo, marco 1 (FW1), marco 2 (FW2), marco 3 (FW3) y/o marco 4 (FW4)) presentes en el producto o derivadas de los genes humanos. Preferiblemente, el marco de la región variable de cadena ligera comprende FW1, FW2 y/o FW3, más preferiblemente FW1, FW2 y FW3 presentes en el producto o derivados de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en V3-11*01 (SEQ ID NO: 24), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) e IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28). Las secuencias de la región marco de cadena ligera como se usan en el presente documento incluyen FW1 (posición 1 a posición 23), FW2 (posición 35 a posición 49), FW3 (posición 57 a posición 88), y FW 4 (posición 98 a posición 108), en donde la posición aminoacídica se indica utilizando el sistema de numeración expuesto en Kabat.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una región marco variable de cadena ligera que es el producto o derivado del gen humano IGHV3-11*01 (SEQ ID NO: 24), y en el que la región marco variable de cadena ligera comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco correspondiente de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino correspondiente.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39, y en el que la región marco variable de cadena ligera de la secuencia de cadena ligera comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco variable de cadena ligera correspondiente del anticuerpo murino correspondiente.

Preferiblemente, la modificación de aminoácidos comprende una sustitución de aminoácidos en la posición aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en 1, 33, 34, 46, 47, 54, 56, y 71 y/o una delección en la posición aminoacídica 31, más preferiblemente una sustitución de aminoácidos en la posición aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en 33, 34, 46, 47, 54, 56, y 71 y/o una delección en la posición aminoacídica 31, mucho más preferiblemente una sustitución de aminoácidos en la posición aminoacídica 46 y/o 47, en donde la posición aminoacídica de cada miembro del grupo se indica según la numeración de Kabat. Específicamente, la modificación de aminoácidos comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 1Q, 33M, 34H, 46P, 47W, 54L, 56S, y 71Y, y/o una delección en T31, preferiblemente una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 1Q, 33M, 34H, 46P, 47W, 54L, 56S y 71Y, más preferiblemente una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 33M, 34H, 46P, 47W y 71Y, mientras que 46P, 47W son particularmente preferidas, en donde la posición aminoacídica de cada miembro del grupo se indica según la numeración de Kabat.

En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano comprende una región marco variable de cadena pesada que es el producto o derivado de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en V2-70*10 (SEQ ID NO: 19), V2-70*01 (SEQ ID NO: 20), V2-70*13 (SEQ ID NO: 21), V2-5*09 (SEQ ID NO: 22), y V2-70*11 (SEQ ID NO: 23), y una región marco variable de cadena ligera que es el producto o derivado de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en V3-11*01 (SEQ ID NO: 24), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) e IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28), preferiblemente una región marco variable de cadena pesada que es el producto o derivado del gen humano V2-70*10 (SEQ ID NO: 19), y una región marco variable de cadena ligera que es el producto o derivado del gen humano V3-11*01 (SEQ ID NO: 24). También se incluyen por la presente invención combinaciones de regiones marco variables de cadena pesada que están presentes en el producto o derivadas de diferentes genes humanos mencionados anteriormente y/o de regiones marco de región variable de cadena ligera que están presentes en el producto o derivadas de diferentes genes humanos mencionados anteriormente.

Se pueden encontrar secuencias de ADN de la línea germinal para genes de la región variable de cadena pesada y ligera humana en la base de datos de secuencias de línea germinal humanas "VBase" (disponible en Internet en www.mrcrpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat EA *et al.*, anteriormente; Tomlinson IM *et al.*, (1992) J. Mol. Biol. 227: 776-798 y Cox JPL *et al.*, (1994) Eur. J. Immunol. 24: 827-836. Como otro ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para genes de la región variable de cadena pesada y ligera humana se pueden encontrar en la base de datos de Genbank.

En otro aspecto, la presente descripción también proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano, en el que al menos una de las CDR de cadena pesada y/o al menos una de las CDR de cadena ligera comprende al menos una modificación aminoacídica. La mutagénesis de sitio dirigido o la mutagénesis mediada por PCR pueden realizarse para introducir la modificación o modificaciones y el efecto sobre la unión al anticuerpo, u otras propiedades funcionales de interés puede evaluarse en ensayos *in vitro* o *in vivo*. Preferiblemente se introducen modificaciones conservativas. La modificación o modificaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos, pero son preferiblemente sustituciones. Típicamente, no se realizan más de cinco, preferiblemente no más de cuatro, más preferiblemente no más de tres, incluso más preferiblemente no más de dos, mucho más preferiblemente no más de una modificación aminoacídica dentro de una región CDR.

En ciertas realizaciones, las secuencias marco pueden usarse para diseñar regiones variables para producir anticuerpos variantes. Los anticuerpos variantes de la invención incluyen aquellos en los que se han realizado modificaciones a residuos marco dentro de VH y/o VK, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, dichas modificaciones de marco se realizan para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es "retromutar" uno o más residuos marco en la secuencia murina correspondiente o "retromutar" uno o más residuos marco en una secuencia de línea germinal correspondiente.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano, en el que al menos una de las secuencias de región marco de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco correspondiente de la región variable de cadena pesada del anticuerpo murino correspondiente. Preferiblemente, la modificación de aminoácidos es una sustitución de aminoácidos. Típicamente, no se realizan más de seis, preferiblemente no más de cinco, preferiblemente no más de cuatro, más preferiblemente no más de tres, incluso más preferiblemente no más de dos, mucho más preferiblemente no más de una modificación aminoacídica dentro de una región marco. En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano, en el que la modificación de aminoácidos de las regiones marco de la región variable de cadena pesada comprende una sustitución de aminoácidos en la posición aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en 23, 35b, 48, 50, 60 y 62, y en donde la posición aminoacídica de cada miembro del grupo se indica según la numeración de Kabat. La sustitución de aminoácidos preferida de las regiones marco de la región variable de cadena pesada es en las posiciones aminoacídicas seleccionadas del grupo que consiste en 23, 35b, 50, 60 y 62. Las sustituciones de aminoácidos más preferidas de las regiones marco de la región variable de cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste en 23S, 35bG, 48L, 50H, 60N y 62A, mientras que 35bG es la sustitución de aminoácidos más preferida de las regiones marco de la región variable de cadena pesada.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano, en el que al menos una de las secuencias de región marco de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco correspondiente de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino correspondiente. Preferiblemente, la modificación de aminoácidos es una sustitución de aminoácidos y/o una deleción de aminoácidos. Típicamente, no se realizan más de seis, preferiblemente no más de cinco, preferiblemente no más de cuatro, más preferiblemente no más de tres, incluso más preferiblemente no más de dos, mucho más preferiblemente no más de una modificación aminoacídica dentro de una región marco. En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo, en el que la modificación de aminoácidos de las regiones marco de la secuencia de la región variable de cadena ligera comprende una sustitución de aminoácidos en la posición aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en 1, 33, 34, 46, 47, 54, 56 y 71 y/o una deleción en la posición aminoacídica 31. Las modificaciones aminoacídicas más preferidas de las regiones marco de la secuencia de la región variable de cadena ligera comprenden una deleción en Y31 y/o una sustitución seleccionada del grupo que consiste en 1Q, 33M, 34H, 46P, 47W, 54L, 56S y 71Y, y en donde la posición aminoacídica de cada miembro del grupo se indica según la numeración de Kabat. Las modificaciones aminoacídicas más preferidas de las regiones marco de la secuencia de la región variable de cadena ligera comprenden una deleción en T31 y/o una sustitución seleccionada del grupo que consiste en 33M, 34H, 46P, 47W y 71Y, mientras que 46P, y/o L47W se prefieren particularmente. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de la presente invención puede comprender modificaciones de aminoácidos de las regiones marco de la secuencia de región variable de cadena pesada como se ha expuesto anteriormente, y modificaciones de aminoácidos de las regiones marco de la secuencia de la región variable de cadena ligera como se ha expuesto anteriormente.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 29, 58, 59, 77, 78, 79 y 80, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 58, 59, 79 y 80, y más preferiblemente del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 58 y 59. La presente descripción también proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 30, 60, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, y 89, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 60, 86, 87 y 89, más preferiblemente SEQ ID NO: 60. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 29, 58, 59, 77, 78, 79 y 80, y una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 30, 60, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, y 89. Dado que cada una de estas secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera se pueden "mezclar y combinar" para crear moléculas de unión anti-OX40 de la invención. La unión a OX40 de dichos anticuerpos "mezclados y combinados" se puede analizar usando los ensayos de unión descritos, por ejemplo, en los Ejemplos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 58 y 59, y una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 60 y 89. En realizaciones más preferidas, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89, una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89. Mucho más preferido es un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 58 y 59, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 35, 36, 37 y 38, y más preferiblemente del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 37 y 38. La presente descripción también proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 y 49, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 45, 46, 47 y 49, más preferiblemente SEQ ID NO: 47. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38, y una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 y 49. Dado que cada una de estas secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera se puede unir al OX40 humano, las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera se pueden "mezclar y combinar" para crear moléculas de unión anti-OX40 de la invención. La unión a OX40 de dichos anticuerpos "mezclados y combinados" se puede analizar usando los ensayos de unión descritos, por ejemplo, en los Ejemplos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 37 y 38, y una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 47 y 49. En realizaciones más preferidas, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, o una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49. Mucho más preferido es un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una secuencia de

cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 37 y 38, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47.

5 En una realización de la presente descripción, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo es un anticuerpo murino, anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado, preferiblemente un anticuerpo humanizado, más preferiblemente un anticuerpo murino monoclonal, un anticuerpo quimérico monoclonal, o un anticuerpo monoclonal humanizado.

10 La presente descripción también proporciona un anticuerpo monovalente o fragmento del mismo que se une al OX40 humano, es decir, un anticuerpo que consiste en un único brazo de unión a antígeno. La presente descripción también proporciona un fragmento de un anticuerpo que se une al OX40 humano seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')₂, scFv, dímeros de Fv monocatenarios biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos y scFv genéticamente condensado al mismo anticuerpo o uno diferente. Los fragmentos preferidos son scFv, dímeros de Fv monocatenarios biespecíficos y diacuerpos. La presente descripción también
15 proporciona un anticuerpo de longitud completa que se une al OX40 humano.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende además una región constante pesada y/o ligera, en particular, una región constante pesada humana y/o ligera humana. Las regiones constantes pesadas humanas pueden seleccionarse del grupo que inmunoglobulinas
20 humanas que consisten en IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD), o IgE (IGHE), mientras que se prefiere la región constante pesada humana IgG, en particular IgG1 (IGHG1). La región constante ligera humana puede seleccionarse del grupo de inmunoglobulinas humanas que consiste en regiones constantes kappa o lambda, mientras que se prefiere la región constante kappa humana. En una realización preferida, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano
25 comprende un dominio constante pesado de IgG1 humana (IGHG1) y un dominio constante kappa de ligero humano.

Además, o como alternativa a las modificaciones realizadas dentro de las regiones marco o regiones CDR, los anticuerpos de la invención pueden diseñarse para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para
30 alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, fijación al complemento, unión al receptor Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, uno o más restos químicos se pueden unir al anticuerpo) o modificarse para alterar su glucosilación. Cada una de estas realizaciones se describe con más detalle a continuación. Las modificaciones dentro de la región Fc como se detalla a continuación son según la numeración de EU de residuos
35 en la región Fc. En una realización, la región bisagra de CH1 se modifica de tal forma que el número de residuos de cisteína en la región bisagra se altere, por ejemplo, aumenta o disminuye. Este enfoque se describe adicionalmente en la Patente de Estados Unidos N.º 5.677.425 de Bodmer et al. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada o aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo. En otra realización, la región bisagra de Fc de un anticuerpo está mutada
40 para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de la interfaz de dominio CH2-CH3 del fragmento bisagra de Fc de manera que el anticuerpo tiene una unión deteriorada a la proteína A estafilocócica (SpA) con respecto a la unión a SpA del dominio bisagra de Fc nativo. Este enfoque se describe con más detalle en la Patente de Estados Unidos N.º 6.165.745 de Ward et al. En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Son
45 posible diversos enfoques. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o CL para contener un epítipo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al. En una realización
50 adicional, la región Fc se altera reemplazando al menos un residuo aminoacídico con un residuo aminoacídico diferente para alterar la función o funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 pueden reemplazarse por un residuo aminoacídico diferente de tal forma que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector pero conserve la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo parental. El ligando efector al que se modifica la afinidad
55 puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 de complemento. Este enfoque se describe con más detalle en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter et al. En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 329, 331 y 322 pueden reemplazarse con un residuo de aminoácido diferente de tal forma que el anticuerpo tenga alterada la unión a C1q y/o reducida o suprimida la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este enfoque se describe con más detalle en las

Patentes de Estados Unidos N.º 6.194.551 de Idusogie et al. En otro ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos en las posiciones aminoacídicas 231 a 238 en la región N-terminal del dominio CH2 se alteran para alterar de este modo la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la Publicación PCT WO94/29351 de Bodmer et al. En otro ejemplo más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcy mediante la modificación de uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439.

Este enfoque se describe adicionalmente en la Publicación PCT WO00/42072 de Presta.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende regiones constantes pesadas y/o ligeras humanas, en el que la región constante pesada humana comprende una variante isotípica que comprende la región CH1, la región bisagra, la región CH2 y región CH3 de IgG4 humana (IGHG4), y en el que la región bisagra comprende una sustitución de serina en la posición 228 por prolina. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado que comprende la variante isotípica es un anticuerpo de longitud completa. Un anticuerpo humanizado preferido particular o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una variante isotípica que comprende CH1 de IgG4 humana (IGHG4), la bisagra de IgG4 humana (IGHG4), que tiene una sustitución S228P, y la CH2 y CH3 de IgG4 humana (IGHG4) comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47. Se ha encontrado que la variante isotípica no presenta mecanismos de citotoxicidad mediados por Fc tal como ADCC, en comparación con un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una región constante pesada humana de IgG1 humana (IGHG1) (que usualmente es una IgG1 humana nativa), es decir, en comparación con un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que solo difiere de la variante isotípica con respecto a la región constante pesada modificada.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende una región Fc de IgG humana, en el que la estructura de carbohidrato central madura unida a la región Fc de IgG humana carece de fucosa (denominada en el presente documento, como alternativa, "no fucosilada"). Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región Fc de IgG1 humana (IGHG1), en la que la estructura de carbohidrato central madura unida a la región Fc de IgG1 humana (IGHG1) carece de fucosa. Más preferido es un anticuerpo de longitud completa que comprende una región Fc de IgG1 humana (IGHG1), en la que la estructura de carbohidrato central madura unida a la región Fc de IgG1 humana (IGHG1) carece de fucosa. Se sabe a partir del documento WO03/035835 que la falta de fucosa en la estructura de carbohidrato central madura unida a la región Fc de IgG humana puede potenciar la ADCC. Por lo tanto, en una realización adicional, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo de la presente descripción comprende una región Fc de IgG1 humana (IGHG1), en la que la estructura de carbohidrato central madura unida a la región Fc de IgG1 humana (IGHG1) carece de fucosa, mientras que el anticuerpo que carece de fucosa presenta una ADCC potenciada en comparación con el anticuerpo humanizado parental o un fragmento del mismo que no contiene fucosa. Los métodos para generar anticuerpos que carecen de fucosa son, por ejemplo (a) el uso de una célula huésped modificada o mutante que es deficiente en el metabolismo de la fucosa de modo que tiene una capacidad reducida para (o es incapaz de) fucosilar proteínas expresadas en la misma; (b) cultivar células en condiciones que evitan o reducen la fucosilación; (c) la eliminación postraducciona de fucosa (por ejemplo, con una enzima fucosidasa); (d) la adición postraducciona del carbohidrato deseado, por ejemplo, después de la expresión recombinante de una glucoproteína no gluco-silada; o (e) la purificación de la glucoproteína para seleccionar el producto que no está fucosilado. Preferiblemente se usan los métodos descritos en el Ejemplo 14 del documento WO10/095031, por ejemplo, los métodos descritos en Longmore et al., (1982) Carbohydr. Res. 365-92 o en Imai-Nishiya et al., (2007), BMC Biotechnol. 7: 84.

También se proporciona por la presente invención un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano y que se une al mismo epítipo que el anticuerpo que comprende la secuencia variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 7 y/o la secuencia variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 8. También se proporciona mediante la presente invención una región específica o epítipo de OX40 humano, en particular del dominio extracelular del receptor OX40 humano, que está unido por un anticuerpo proporcionado por la presente invención, en particular por un anticuerpo que comprende la secuencia variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 7 y/o la secuencia variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 8. Esta región específica o epítipo del polipéptido OX40 humano se puede identificar mediante cualquier método de mapeo de epítopos adecuado conocido en la técnica junto con uno cualquiera de los anticuerpos proporcionados por

la presente invención. Los ejemplos de tales métodos incluyen cribar péptidos de diferentes longitudes derivados de OX40 para unirse al anticuerpo de la presente invención con el fragmento más pequeño que se puede unir específicamente al anticuerpo que contiene la secuencia del epítipo reconocido por el anticuerpo. Los péptidos OX40 pueden producirse sintéticamente o mediante digestión proteolítica del polipéptido OX40. Los péptidos que se unen al anticuerpo se pueden identificar mediante, por ejemplo, análisis de espectrometría de masas. En otro ejemplo, se pueden usar la espectroscopía de RMN o la cristalografía de rayos X para identificar el epítipo unido por un anticuerpo de la presente invención. Una vez identificado, el fragmento epitópico que se une a un anticuerpo de la presente invención se puede usar, si se requiere, como un inmunógeno para obtener anticuerpos antagonistas adicionales que se unen al mismo epítipo.

10

Propiedades del anticuerpo anti-OX40

Se conocen en la técnica ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos hacia, por ejemplo, OX40 humano, incluyendo, por ejemplo, ELISA, BIAcore®, transferencias Western, RIA y análisis de citometría de flujo. Los ensayos adecuados se describen en detalle en los Ejemplos. La cinética de unión (por ejemplo, afinidad de unión como KD) de los anticuerpos también puede evaluarse mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica, tales como mediante análisis de sistema Scatchard o BIAcore®. La afinidad de unión relativa K_i puede evaluarse mediante ensayos de competición estándar conocidos en la técnica.

15

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen al OX40 humano y que bloquean una Reacción de Linfocitos Mixtos Humanos (MLR) de una manera dependiente de la dosis en un grado más alto que el anticuerpo humanizado recombinante efalizumab. El anticuerpo humanizado recombinante efalizumab se une a la subunidad CD11a del antígeno 1 asociado a la función linfocitaria. La MLR puede realizarse y medirse de acuerdo con el Ejemplo 3.

20

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen al OX40 humano y que también son capaces de reconocer OX40 de mono cynomolgus. La unión de un anticuerpo anti-OX40 antagonista a células mononucleares de sangre periférica (PBMC) tanto humanas como de cynomolgus se puede realizar y medir de acuerdo con el Ejemplo 4 y se muestra en la figura 3. Se encontró que el anticuerpo reconoce OX40 expresado en la superficie de linfocitos activados humanos y de mono cynomolgus que indican que este anticuerpo tiene propiedades de reactividad cruzada.

25

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen al OX40 humano, en particular OX40 humano en forma aislada, con una afinidad (K_D) de 500 nM o menos, preferiblemente 200 nM o menos, más preferiblemente 150 nM o menos, más preferiblemente 120 nM o menos, incluso más preferiblemente 110 nM o menos, por ejemplo, medida por resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIAcore® (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza) mediante la captura del anticuerpo en un chip sensor de grado de investigación CM5 acoplado a proteína A (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza; BR-1000-14) con un dominio extracelular del receptor OX40 humano monovalente recombinante (SEQ ID NO: 11) usado como analito como se detalla en los Ejemplos 5 y 6 y como se ilustra en la figura 4. "Monovalente" como se usa en el presente documento en relación con las mediciones de afinidad usando el receptor OX40 se refiere a un dominio del receptor OX40 humano, como el dominio extracelular, no dimerizado artificialmente o multimerizado como sería, por ejemplo, si el dominio se fusionase en el extremo amino con una porción Fc de inmunoglobulina. En un aspecto preferido, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que conserva al menos el 75% de la afinidad de unión a OX40 (K_D) del anticuerpo quimérico correspondiente. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo se une al OX40 humano con afinidad equivalente al anticuerpo quimérico correspondiente. Por "afinidad equivalente" se refiere a un valor de afinidad que está dentro de un intervalo de $\pm 10\%$ de la afinidad de unión a OX40 del anticuerpo quimérico correspondiente. Más preferiblemente, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al OX40 humano con una afinidad mayor que el anticuerpo quimérico correspondiente. En un aspecto preferido de la presente invención, se proporcionan anticuerpos antagonistas o fragmento de los mismos que se unen al OX40 humano que tienen una afinidad de unión (K_D) de 110 nM o menos, preferiblemente 100 nM o menos, más preferiblemente 90 nM o menos, más preferiblemente 80 nM o menos, incluso más preferiblemente 70 nM o menos, por ejemplo, medida por resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIAcore® (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza) mediante la captura del anticuerpo en un chip sensor de grado de investigación CM5 acoplado a proteína A (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza; BR-1000-14) con un dominio extracelular del receptor OX40 humano monovalente recombinante (SEQ ID NO: 11) usado como analito como se detalla en los Ejemplos 5 y 6 y como se ilustra en la figura 4.

30

35

40

45

50

55

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen al OX40 humano y que tienen buena estabilidad térmica. En una realización, preferida un anticuerpo humanizado antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano tiene una temperatura de termostabilidad del fragmento FAB superior a 70 °C, preferiblemente superior a 75 °C, más preferiblemente superior a 80 °C e incluso más preferiblemente superior a 85 °C. Para el análisis de la termostabilidad del fragmento FAB, se utilizan mediciones de calorimetría de barrido diferencial, mientras que se identifica una temperatura de fusión del punto medio del fragmento FAB en el contexto de una IgG de longitud completa. Este tipo de mediciones calorimétricas son conocidas por el experto en la técnica y se pueden realizar de acuerdo con, por ejemplo, Garber & Demarest (2007), BBRC, 355: 751-7, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 6 y se muestra en la figura 6.

En un aspecto adicional, la presente invención describe anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen a un epítipo en la región extracelular de OX40 humano. Como se describe en el Ejemplo 7 y se muestra en la figura 7, uno o más de los cuatro dominios de la región extracelular de OX40 se intercambiaron entre secuencias humanas y de rata y se generaron proteínas de fusión Fc. Luego se realizó un ELISA de unión para probar la reactividad de un anticuerpo humanizado antagonista en la región extracelular de OX40 humano, la región extracelular de OX40 de rata y cuatro proteínas quiméricas de humano-rata. Por lo tanto, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se mapea dentro del segundo dominio de la región extracelular de OX40 humano.

La presente invención también proporciona anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que se pueden usar para suprimir las reacciones inmunes. El efecto de un anticuerpo anti-OX40 humanizado antagonista se ensayó en una MLR (véase el Ejemplo 8) usada como modelo *in vitro* de activación y proliferación de linfocitos T alorreactivos (O'Flaherty E et al., (2000) Immunology, 100(3): 289-99; DuPont B & Hansen JA (1976) Adv. Immunol. 23: 107-202). Las PBMC de dos donantes no emparentados se mezclaron, dando como resultado la activación de linfocitos T y una proliferación de linfocitos T. Además, se ensayaron tres formatos diferentes del anticuerpo anti-OX40 humanizado antagonista en este ensayo: un formato de IgG1 (IGHG1), un formato de IgG1 no fucosilada (IGHG1) y un formato de IgG4 (IGHG4), para determinar adicionalmente la contribución de los mecanismos citotóxicos tal como ADCC en la inhibición de MLR. El anticuerpo anti-OX40 humanizado antagonista inhibió eficazmente la MLR en dos individuos diferentes (respondedores) con valores de CE50 de aproximadamente 100 ng/ml. Sin embargo, los resultados mostraron una diferencia dependiendo del formato del anticuerpo utilizado. En el primer individuo (respondedor 1), la reactividad de los linfocitos T fue inhibida eficientemente por los formatos de anticuerpos IgG1 (IGHG1) e IgG4 (IGHG4), lo que indica que los mecanismos citotóxicos no son críticos para este individuo. Para el segundo individuo (respondedor 2), el formato de IgG1 (IGHG1) logró más del 60% de inhibición, mientras que el formato de IgG4 (IGHG4) solo bloqueó deficientemente la MLR. En ambos individuos, el formato de IgG1 no fucosilada (IGHG1) fue muy eficaz en la inhibición de la MLR. Estos resultados indican que el bloqueo de la activación de OX40 puede ser suficiente en algunos individuos para inhibir la MLR, pero este efecto puede mejorarse en gran medida mediante mecanismos citotóxicos adicionales. Por lo tanto, para el tratamiento de pacientes que padecen trastornos mediados por OX40, en los que el trastorno parece ser independiente del estado coestimulante del OX40 de los pacientes, por ejemplo, pacientes con bajos niveles de expresión de OX40, la administración de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano y que tiene mecanismos citotóxicos potenciados puede ser particularmente eficaz. Una realización preferida de la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado antagonista que se une al OX40 humano para el tratamiento de un paciente que padece un trastorno mediado por OX40. Además, el paciente puede tener bajos niveles de expresión de OX40. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado antagonista que se une al OX40 humano comprende una región IgG1 (IGHG1). Más preferiblemente, el anticuerpo humanizado antagonista que se une al OX40 humano comprende una región IgG1 no fucosilada.

En un aspecto adicional de la presente invención, se demostró el efecto de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo en una reacción xenogénica de injerto contra huésped, en la que los ratones SCID se reconstituyeron con PBMC humanas. Esta reacción proporciona un modelo para la enfermedad alogénica de injerto contra huésped (GVHD) observada después del trasplante de médula ósea en pacientes humanos. En este modelo, las PBMC humanas y los linfocitos T en particular, lanzan una fuerte respuesta contra las células huésped de ratón que da lugar a síntomas inflamatorios graves. Como se describe en el Ejemplo 9 y se muestra en la figura 9 y en la Tabla 10, un anticuerpo humanizado antagonista que se une al OX40 humano reprimió potentemente la reacción de GVHD a una dosis de 1 mg/kg. Sorprendentemente, este anticuerpo demostró una mejor eficacia que Enbrel®, una terapia reconocida para GVHD (Xhaard A et al., (2011) Bull. Cancer, 98(8): 889-99; Simpson D (2001) Expert Opin. Pharmacother. 2(7): 1109-17). Por lo tanto, en una realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano y que es eficaz en el tratamiento de

GVHD. Preferiblemente, la administración del anticuerpo a un sujeto da como resultado una mejora de cuatro veces en la media de supervivencia (días) en comparación con la administración del vehículo. Más preferiblemente, la administración del anticuerpo a un sujeto da como resultado una mejora de dos veces en la media de supervivencia (días) en comparación con la administración de Enbrel®. Por lo tanto, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista o fragmento que se une al OX40 humano que es más eficaz que Enbrel® en el tratamiento de un paciente con GVHD y/o en la supresión de GVHD. Además, se ha informado que los anticuerpos de unión anti-OX40 agonistas empeoran la GVHD en modelos alogénicos de GVHD de ratón (Valzasina B et al., (2005) Blood, 105(7): 2845-51; Blazar BR et al., (2003) Blood, 101(9): 3741-8), por lo tanto, se puede concluir a partir del Ejemplo 9, que los anticuerpos antagonistas y fragmentos de los mismos de la presente invención no muestran efectos agonistas sobre la unión de OX40 humano, ya que no se observó empeoramiento de la GVHD en el modelo. Por lo tanto, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento que se une al OX40 humano que no muestra actividad agonista en la unión.

Ácidos nucleicos, vectores y células huésped

La presente descripción también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen a OX40 humano, vectores y células huésped que comprenden el ácido nucleico o el vector. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, mediante técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros ya conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no secuencias de intrones. En una realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener usando técnicas estándar de biología molecular, por ejemplo, los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo o que codifican los segmentos VH y VL, se pueden obtener por amplificación por PCR estándar o técnicas de clonación de ADNc. Para anticuerpos obtenidos a partir de una genoteca de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de presentación en fagos), pueden recuperarse de la biblioteca uno o más ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo. Los métodos para introducir ácido nucleico exógeno en células huésped se conocen bien en la técnica, y variarán con la célula huésped utilizada. Las técnicas incluyen, pero sin limitación, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato cálcico, tratamiento con cloruro cálcico, transfección mediada por polietilénimina, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, infección viral o por fagos, encapsulación del polinucleótido o polinucleótidos en liposomas, y microinyección directa del ADN en los núcleos. En el caso de células de mamífero, la transfección puede ser transitoria o estable.

Las moléculas de ácidos nucleicos preferidas de la invención son las que codifican la secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38, y/o la secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 y 49. Las moléculas de ácidos nucleicos preferidas de la invención son las que codifican la región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 29, 58, 59, 77, 78, 79 y 80, y/o la región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 30, 60, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, y 89.

Las moléculas de ácidos nucleicos preferidas de la invención son las que codifican la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 8 y/o la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7, por ejemplo, ADN que codifica la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9 y/o ADN que codifica la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 10. Las moléculas de ácido nucleico más preferidas de la invención son las que codifican la región variable de cadena pesada de SEQ ID NOS: 58 o 59 y/o la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 60, por ejemplo, ADN que codifica la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NOS: 61 o 62 y/o ADN que codifica la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 63, que son mucho más preferidas.

Una vez que se obtienen fragmentos de ADN que codifican segmentos VH y VL, estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente por técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de la cadena de anticuerpo de longitud completa, o genes de fragmentos correspondientes a los fragmentos descritos anteriormente como los genes del fragmento Fab o un gen scFv. En estas

manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH se une operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. El término "unido operativamente", como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN están unidos de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco. El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de cadena pesada humana se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat EA *et al.*, anteriormente) y los fragmentos de ADN que incluyen estas regiones se pueden obtener por amplificación PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD), o IgE (IGHE), pero mucho más preferiblemente es una región constante de IgG1 (IGHG1). Para un gen de cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica VH se puede unir operativamente a otra molécula de ADN que codifica solo la región constante CH1 de cadena pesada. El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera Fab) uniendo operativamente el ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de cadena ligera humana se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat EA *et al.*, anteriormente) y los fragmentos de ADN que incluyen estas regiones se pueden obtener por amplificación PCR estándar. En realizaciones preferidas, la región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, preferiblemente una región constante kappa. Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se unen operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4 -Ser)3, de tal forma que las secuencias VH y VL pueden expresarse como una proteína monocatenaria contigua, con las regiones VL y VH unidas por el enlazador flexible (véase, por ejemplo, Bird RE *et al.*, (1988) *Science*, 242: 423-426; Huston JS *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-83; McCafferty J *et al.*, (1990) *Nature*, 348: 552-554). Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo de los anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron a través de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto K *et al.*, (1992) *J. Biochem. & Biophysical Methods*, 24: 107-117 y Brennan M *et al.*, (1985) *Science*, 229: 81-3). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente por células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter P *et al.*, (1992) *Bio/Technology*, 10: 163-167). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el experto en la técnica. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv), véase, por ejemplo, el documento WO 1993/16185; Pat. de Estados Unidos N.º 5.571.894 y Pat. de Estados Unidos N.º 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.641.870, por ejemplo.

Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la presente invención se pueden incorporar en un vector, preferiblemente un vector de expresión para expresar la proteína. Se puede utilizar una diversidad de vectores de expresión para la expresión de proteínas. Los vectores de expresión pueden comprender vectores extracromosómicos autorreplicantes o vectores que se integran en un genoma huésped. Los vectores de expresión se construyen para que sean compatibles con el tipo de célula huésped. Por lo tanto, los vectores, preferiblemente los vectores de expresión, que encuentran uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, aquellos que permiten la expresión de proteínas en células de mamífero, bacterias, células de insectos, levaduras y en sistemas *in vitro*. Como se conoce en la técnica, están disponibles una diversidad de vectores de expresión, comercialmente o de otro modo, que pueden encontrar uso en la presente invención para expresar anticuerpos.

Los vectores de expresión típicamente comprenden una proteína unida operativamente con secuencias reguladoras o de control, marcadores seleccionables, cualquier pareja de fusión y/o elementos adicionales. Por "unido operativamente" en el presente documento significa que el ácido nucleico se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (*Gene Expression Technology, Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). En general, estos vectores de expresión incluyen ácido nucleico regulador transcripcional y traduccional unido operativamente al ácido nucleico que codifica el anticuerpo, y son típicamente apropiados para la célula huésped utilizada para expresar la proteína. En general, las secuencias reguladoras de transcripción y traducción pueden incluir secuencias promotoras, sitios de unión ribosómica, secuencias de inicio y detención de la transcripción, secuencias de inicio y detención de la traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras. Como también se

conoce en la técnica, los vectores de expresión contienen típicamente un gen o marcador de selección para permitir la selección de células huésped transformadas que contienen el vector de expresión. Los genes de selección se conocen bien en la técnica y variarán con la célula huésped utilizada. Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr- con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para selección de G418).

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento son células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Los procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, incluyendo organismos gram-negativos o gram-positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Los huéspedes de clonación de *E. coli* adecuados incluyen *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Además de procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es la más utilizada entre los microorganismos huésped eucariotas inferiores. Sin embargo, varios otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* incluyendo *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. WaltH* (ATCC 56.500), *K. drosopmarum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, o *K. marxianusyarrowia* (documento EP402226); *Pichia pastoris* (documento EP183070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP244234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos, incluyendo *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, o huéspedes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* o *A. niger*.

Las células huésped adecuadas para la expresión de los anticuerpos de la invención se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y se han identificado células huésped de insectos permisivas correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes augypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Una diversidad de cepas virales para transfección están disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus pueden usarse, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco también se pueden utilizar como huéspedes.

Las células huésped para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención son preferiblemente células huésped de mamífero que incluyen ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub G & Chasin LA (1980) Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 77: 4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman RJ & Sharp PA (1982) J. Mol. Biol, 159: 601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para su uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión génica GS descrito en los documentos WO 87/04462 (de Wilson), WO 89/01036 (de Bebbington) y EP338841 (de Bebbington). Cuando se introducen genes de anticuerpos recombinantes en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, para la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que crecen las células huésped. Las células huésped útiles para producir anticuerpos que se unen al OX40 humano se pueden cultivar en una diversidad de medios. Medios comercialmente disponibles tales como Ham's F10 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza), medio mínimo esencial (MEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Basilea, Suiza) y medio Eagle modificado de Dulbecco ((DMEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) son adecuados para el cultivo de células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando métodos estándar de purificación de proteínas.

Los anticuerpos se pueden unir operativamente a un compañero de fusión para permitir el direccionamiento de la proteína expresada, la purificación, el cribado, la presentación y similares. Los compañeros de fusión se pueden unir a la secuencia del anticuerpo a través de secuencias enlazadoras. La secuencia enlazadora generalmente comprenderá una pequeña cantidad de aminoácidos, típicamente menos de diez, aunque también se pueden usar enlazadores más largos. Típicamente, las secuencias enlazadoras se seleccionan para que sean flexibles y resistentes a la degradación. Como apreciarán los expertos en la técnica, cualquiera de una amplia variedad de secuencias se puede usar como enlazadores. Por ejemplo, una secuencia enlazadora común comprende la

secuencia de aminoácidos GGGGS. Un compañero de fusión puede ser una secuencia de direccionamiento o señal que dirige el anticuerpo y cualquier pareja de fusión asociada a una ubicación celular deseada o a los medios extracelulares. Como se conoce en la técnica, ciertas secuencias de señalización pueden dirigirse a una proteína a secretar en el medio de crecimiento, o en el espacio periplásmico, localizado entre la membrana interna y externa de la célula. Un compañero de fusión también puede ser una secuencia que codifica un péptido o proteína que permite la purificación y/o el cribado. Dichos compañeros de fusión incluyen, pero sin limitación, etiquetas de polihistidina (His-tags) (por ejemplo, H6 y H10 u otras etiquetas para su uso con sistemas de cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) (por ejemplo, Columnas de afinidad de Ni²⁺)), fusiones GST, fusiones MBP, etiqueta de estreptomycin, la secuencia diana de biotilación BSP de la enzima bacteriana BirA, y etiquetas de epítomos que se dirigen por anticuerpos (por ejemplo, etiquetas c-myc, etiquetas de indicadores, y similares). Como apreciarán los expertos en la técnica, dichas etiquetas pueden ser útiles para la purificación, el cribado o ambos.

Construcción y producción de anticuerpos

15 Los anticuerpos generados contra el polipéptido OX40 pueden obtenerse por inmunización de un animal, es decir, administrando los polipéptidos a un animal, preferiblemente un animal no humano, usando protocolos ya conocidos y de rutina, véase, por ejemplo, el Handbook of Experimental Immunology (Weir DM (ed.), Vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos o cerdos pueden ser inmunizados. Sin embargo, los ratones, conejos, cerdos y ratas, en particulares los ratones, son generalmente los más adecuados. Los anticuerpos también se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas por el experto. En los anticuerpos adicionales se pueden producir mediante la escisión enzimática o química de los anticuerpos de origen natural. Los anticuerpos humanizados de la presente invención se pueden construir transfiriendo una o más CDR o porciones de las mismas de regiones VH y/o VL de un animal no humano (por ejemplo, ratón) a una o más regiones marco de regiones VH y/o VL humanas. Opcionalmente, los residuos marco humanos presentes de este modo en las regiones VH y/o VL pueden reemplazarse por residuos no humanos correspondientes (por ejemplo, ratón) cuando sea necesario o se desee, para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o mantener la afinidad de unión. Opcionalmente, los residuos de aminoácidos no humanos presentes en las CDR pueden reemplazarse por residuos humanos. Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención se pueden preparar basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal no humano preparado como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede obtenerse a partir del hibridoma no humano de interés y diseñarse para contener secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo, humanas) usando técnicas de biología molecular convencionales. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas se pueden unir a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567 de Cabilly et al). Para crear un anticuerpo humanizado, se pueden insertar regiones CDR murinas en un marco humano utilizando métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 5.225.539 de Winter, y las Patentes de Estados Unidos N.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al).

40 Se pueden construir anticuerpos humanizados de la presente invención en los que la molécula aceptora humana para la región variable de cadena pesada se selecciona basándose en consideraciones de homología entre las regiones variables de la molécula aceptora potenciales y la región variable de cadena pesada del anticuerpo murino. Se prefieren moléculasceptoras humanas candidatas de línea germinal para reducir la inmunogenicidad potencial. Las bases de datos de línea germinal están compuestas de secuencias de anticuerpos que se leen a través del extremo de la región FW3 de cadena pesada y parcialmente en la secuencia CDR3. Para la selección de una región FW4, se pueden buscar bases de datos de secuencias de anticuerpos maduros que se han derivado de la molécula de línea germinal seleccionada o se pueden usar secuencias de anticuerpos que se han derivado de la molécula de línea germinal seleccionada de un donante humano. Las moléculasceptoras humanas se seleccionan preferiblemente de la misma clase de cadena pesada que la molécula donante murina, y de la misma clase estructural canónica de la región variable de la molécula donante murina. Las consideraciones secundarias para la selección de la molécula aceptora humana para la región variable de cadena pesada eluden la homología en la longitud de CDR entre la molécula donante murina y la molécula aceptora humana. Las moléculas de anticuerpo aceptor humano se seleccionan preferiblemente mediante búsqueda de homología en la base de datos V-BASE, aunque también pueden usarse otras bases de datos tales como Kabat y las bases de datos públicas de NCBI.

55 Se pueden construir anticuerpos humanizados de la presente invención en los que la molécula aceptora humana para la región variable de cadena ligera se selecciona basándose en consideraciones de homología entre las regiones variables de la molécula aceptora potenciales y con la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino. Se prefieren moléculasceptoras humanas candidatas de línea germinal para reducir la inmunogenicidad

potencial. Las bases de datos de línea germinal están compuestas de secuencias de anticuerpos que se leen a través del extremo de la región FW3 de cadena pesada y parcialmente en la secuencia CDR3. Para la selección de una región FW4, se pueden buscar bases de datos de secuencias de anticuerpos maduros que se han derivado de la molécula de línea germinal seleccionada o se pueden usar secuencias de anticuerpos que se han derivado de la molécula de línea germinal seleccionada de un donante humano. Las moléculasceptoras humanas se seleccionan preferiblemente de la misma clase de cadena ligera que la molécula donante murina, y de la misma clase estructural canónica de la región variable de la molécula donante murina. Las consideraciones secundarias para la selección de la molécula aceptora humana para la región variable de cadena ligera incluyen la homología en la longitud de CDR entre la molécula donante murina y la molécula aceptora humana. Las moléculas de anticuerpo receptor humano se seleccionan preferiblemente mediante búsquedas de homología en la base de datos V-BASE, y también pueden usarse otras bases de datos tales como Kabat y las bases de datos públicas de NCBI. Los métodos para humanizar un anticuerpo no humano se describen en el presente documento, incluido en el Ejemplo 6, a continuación.

La presente invención proporciona un método para producir un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano que comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano o un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano de manera que el ácido nucleico se expresa y el produzca el anticuerpo. Preferiblemente, el anticuerpo está aislado. Para las células huésped, los ácidos nucleicos y los vectores, se pueden usar los descritos anteriormente. La expresión de los ácidos nucleicos puede obtenerse, por ejemplo, mediante una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica como se conoce bien en la técnica (por ejemplo, Morrison S (1985) Science 229: 1202) y como se ha descrito además anteriormente. Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos de los mismos, se pueden obtener ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas parciales o de longitud completa mediante técnicas de biología molecular estándar (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación de ADNc usando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés), y los ADN se pueden insertar en vectores tales como vectores de expresión. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se eligen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en un vector separado o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante métodos estándar (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento y vector génico del anticuerpo, o ligación del extremo romo si no están presentes sitios de restricción). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse para crear genes de anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y constante de cadena ligera del isotipo deseado de tal forma que el segmento VH está unido operativamente al segmento o segmentos CH1 dentro del vector y el segmento VK está unido operativamente al segmento CK dentro del vector.

Caracterización y purificación de anticuerpos anti-OX40

El cribado de anticuerpos se puede realizar usando ensayos para medir la unión a OX40 humano y/o ensayos para medir la capacidad de bloquear la unión de OX40 a su ligando, OX40L. Un ejemplo de un ensayo de unión es un ELISA, en particular, que usa una proteína de fusión de OX40 humano y Fc humano, que está inmovilizada en placas, y que emplea un anticuerpo secundario conjugado para detectar anticuerpo anti-OX40 unido a la proteína de fusión. Un ejemplo de un ensayo de bloqueo es un ensayo basado en citometría de flujo que mide el bloqueo de la unión de la proteína de fusión del ligando de OX40 al OX40 en células CD4 humanas. Se usa un anticuerpo secundario marcado por fluorescencia para detectar la cantidad de proteína de fusión del ligando OX40 que se une a la célula. Este ensayo busca una reducción en la señal ya que el anticuerpo en el sobrenadante bloquea la unión de la proteína de fusión del ligando a OX40. Un ejemplo adicional de un ensayo de bloqueo es un ensayo en el que se mide el bloqueo de coestimulación de linfocitos T sin tratar humanos mediada por la proteína de fusión del ligando OX40 cubierta en una placa midiendo la incorporación de timidina. Como un ensayo para evaluar la actividad funcional de anticuerpos anti-OX40, por ejemplo, la reducción de la activación de linfocitos T, puede usarse la reacción de linfocitos mixtos humanos (MLR) como se describe en los Ejemplos 3 y 8. Los anticuerpos de la presente invención se pueden aislar o purificar de diversas maneras conocidas por los expertos en la técnica. Los métodos de purificación estándar incluyen técnicas cromatográficas, incluyendo intercambio iónico, interacción hidrófoba, afinidad, dimensionado o filtración en gel, y fase reversa, realizadas a presión atmosférica o a alta presión utilizando sistemas tales como FPLC y HPLC. Los métodos de purificación también incluyen técnicas electroforéticas, inmunológicas, de precipitación, de diálisis y de cromatografía. Las técnicas de ultrafiltración y diafiltración, junto con la concentración de proteínas, también son útiles. Para purificar los anticuerpos OX40, las células huésped seleccionadas se pueden hacer crecer en, por ejemplo, matraces giratorios para la purificación de

anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sefara (Pharmacia, Piscataway, NJ). Los anticuerpos eluidos se pueden comprobar mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para garantizar la pureza. Un anticuerpo preferido de la presente invención es, por lo tanto, un anticuerpo aislado y/o purificado que se une al OX40 humano.

5

Inmunocnjugados

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista OX40 o un fragmento del mismo que se une al OX40 humano, unido a un agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un
 10 inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados se denominan en el presente documento "inmunocnjugados". Los inmunocnjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (por ejemplo, destruya) las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracnodiona, mitoxantrona, mitramicina,
 15 actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo descabazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino),
 20 antitriclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Otros ejemplos de citotoxinas terapéuticas que se pueden unir a un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, calicheamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo de calicheamicina está disponible en el mercado (Mylotarg®,
 25 American Home Products). Las citotoxinas se pueden unir a anticuerpos de la invención usando tecnología de enlazador disponible en la técnica. Los ejemplos de tipos de enlazadores que se han usado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptidos. Puede elegirse un enlazador que es, por ejemplo, susceptible de escisión por pH bajo dentro del compartimento lisosómico o susceptible de escisión por proteasas, tales como proteasas expresadas
 30 preferentemente en tejido tumoral tal como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D). Para un análisis adicional de tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, véase también Saito G et al., (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55: 199-215; Trail PA et al., (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52: 328-337; Payne G (2003) Cancer Cell, 3: 207-212; Allen TM (2002) Nat. Rev. Cancer, 2: 750-763; Pastan I & Kreitman RJ (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs, 3: 1089-1091; Senter PD & Springer CJ, (2001) Adv. Drug Deliv.
 35 Rev. 53: 247-264. Los anticuerpos de la presente invención también se pueden unir a un isótopo radiactivo para generar productos radiofarmacéuticos citotóxicos, también denominados radioinmunocnjugados. Los ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero sin limitación, yodo¹³¹, indio¹¹¹, itrio⁹⁰ y lutecio¹⁷⁷. Los métodos para preparar radioinmunocnjugados se establecen en la técnica. Los ejemplos de radioinmunocnjugados están disponibles comercialmente, incluyendo Zevalin® (EDEC
 40 Pharmaceuticals) y Bexxar® (Corixa Pharmaceuticals) y métodos similares pueden usarse para preparar radioinmunocnjugados usando los anticuerpos de la invención. Los inmunocnjugados de anticuerpos de la invención se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada, y el resto de fármaco no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina
 45 enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina de la difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón-γ; o modificadores de la respuesta biológica, tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimador de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

50

Las técnicas para unir tales agentes terapéuticos a anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al., (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson et al., (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987);
 55 Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al., (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al., (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe PE & Ross WC (1982) Immunol. Rev. 62: 119-58.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista OX40 o un fragmento del mismo que se une al OX40 humano, administrado junto con un agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina.

5

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo, de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos, y/o inmunoconjugados de la invención y/o un agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados) que se unen a diferentes epítomos en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias. Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo antagonista OX40 de la presente invención combinado con al menos otro agente antiinflamatorio o inmunosupresor.

20 Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares, que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, 25 anticuerpo o inmunoconjugado, se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio convencional o 30 agente sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención. Los compuestos activos complementarios también pueden incorporarse en las composiciones.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une al OX40 humano unido a un agente 35 terapéutico y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los inmunoconjugados y agentes terapéuticos que se pueden usar son como se ha descrito anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo de la presente invención que comprende además otro agente farmacéuticamente activo. 40 Preferiblemente, el otro agente farmacéuticamente activo es uno o más de: a) otro antagonista de OX40 humano, b) un agente analgésico y c) un agente inmunosupresor, por ejemplo, un glucocorticoide tal como la prednisona.

Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales 45 como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico, y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones 50 farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tal como el oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos. Estas composiciones también pueden contener 55 adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede asegurar tanto mediante procedimientos de esterilización, anteriormente, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsorbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma

farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

Usos terapéuticos y otros usos

- 5 Los anticuerpos antagonistas de la presente invención tienen numerosas utilidades diagnósticas y terapéuticas *in vitro* e *in vivo* que implican el diagnóstico y tratamiento de trastornos mediados por OX40. Por ejemplo, estas moléculas se pueden administrar a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y diagnosticar una diversidad de trastornos mediados por OX40. Los sujetos preferidos son seres humanos e incluyen pacientes que tienen trastornos mediados por la actividad de OX40 (trastornos mediados por OX40). Los anticuerpos antagonistas de la presente invención pueden ser eficaces en el tratamiento de
- 10 pacientes independientemente de su estado coestimulante de OX40. Los sujetos más preferidos son seres humanos e incluyen pacientes que expresan un bajo nivel de OX40.
- 15 Un "paciente" para los fines de la presente invención incluye tanto seres humanos como otros animales, preferiblemente mamíferos y mucho más preferiblemente seres humanos. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención tienen tanto aplicaciones para terapia humana como veterinaria. El término "tratamiento" o "tratar" en la presente invención pretende incluir el tratamiento terapéutico, así como medidas profilácticas, o supresoras para una enfermedad o trastorno. Por lo tanto, por ejemplo, la administración exitosa de un anticuerpo
- 20 antes del inicio de la enfermedad da como resultado el tratamiento de la enfermedad. Como otro ejemplo, la administración exitosa de un anticuerpo después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad comprende el tratamiento de la enfermedad. "Tratamiento" y "tratar" también incluyen la administración de un anticuerpo después de la aparición de la enfermedad con el fin de erradicar la enfermedad. La administración exitosa de un anticuerpo después del inicio y después de que se hayan desarrollado los síntomas
- 25 clínicos, con posible reducción de los síntomas clínicos y quizás la mejora de la enfermedad, comprende el tratamiento de la enfermedad. Aquellos "que necesitan el tratamiento" incluyen mamíferos que ya tienen la enfermedad o trastorno, así como aquellos propensos a tener la enfermedad o trastorno, incluidos aquellos en los que la enfermedad o trastorno se va a prevenir.
- 30 En una realización particular, los anticuerpos antagonistas se usan *in vivo* para tratar, prevenir o diagnosticar una diversidad de trastornos mediados por OX40. Por lo tanto, la invención proporciona un método para tratar un trastorno mediado por OX40 en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo antagonista o fragmento del mismo. Los trastornos mediados por OX40 incluyen infecciones (víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias), choque endotóxico asociado con infección, artritis,
- 35 artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad pilonidal, peritonitis, psoriasis, vasculitis, adherencias quirúrgicas, ictus, diabetes tipo I, enfermedad de Lyme, artritis, meningocelitis, uveítis autoinmune, trastornos inflamatorios mediados inmunológicamente del sistema nervioso central y periférico, tal como
- 40 esclerosis múltiple, lupus (tal como lupus eritematoso sistémico) y síndrome de Guillain-Barré, dermatitis atópica, hepatitis autoinmune, alveolitis fibrosante, enfermedad de Grave, nefropatía IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Meniere, pémfigo, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, pancreatitis, traumatismo (cirugía), enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), rechazo de trasplante, enfermedad cardiovascular, incluyendo enfermedades isquémicas tal como infarto de miocardio, así como
- 45 aterosclerosis, coagulación intravascular, resorción ósea, osteoporosis, osteoartritis, periodontitis, hipoclorhidia y neuromielitis óptica.

Otros trastornos mediados por OX40 ejemplares incluyen infecciones (víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias), choque endotóxico asociado con infección, artritis, artritis reumatoide, asma, bronquitis, gripe, virus respiratorio sincitial, neumonía, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar idiopática (IPF), alveolitis fibrosante criptogénica (CFA), neumonía intersticial fibrosante idiopática, enfisema, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad pilonidal, peritonitis, psoriasis, vasculitis, adherencias quirúrgicas, ictus, diabetes tipo I, enfermedad de Lyme, artritis, meningocelitis, uveítis autoinmune, trastornos inflamatorios mediados inmunológicamente del sistema nervioso central y periférico, tal como

50 esclerosis múltiple, lupus (tal como lupus eritematoso sistémico) y síndrome de Guillain-Barré, dermatitis atópica, hepatitis autoinmune, alveolitis fibrosante, enfermedad de Grave, nefropatía IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Meniere, pémfigo, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, pancreatitis, traumatismo (cirugía), enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), rechazo de trasplante,

55

enfermedad cardiovascular, incluyendo enfermedades isquémicas tal como infarto de miocardio, así como aterosclerosis, coagulación intravascular, resorción ósea, osteoporosis, osteoartritis, periodontitis, hipoclorhidia y neuromielitis óptica.

- 5 Los trastornos mediados por OX40 preferidos a tratar con el anticuerpo de la invención se seleccionan del grupo que consiste en esclerosis múltiple, artritis reumatoide, colitis, psoriasis, asma, EPOC, IPF, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), aterosclerosis y diabetes. Un trastorno mediado por OX40 particularmente preferido a tratar con el anticuerpo de la invención es la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD).
- 10 La presente invención también proporciona un anticuerpo para su uso en el tratamiento del dolor, particularmente el dolor asociado con la inflamación.

- En una realización, los anticuerpos de la invención pueden usarse para detectar niveles de OX40, o niveles de células que contienen OX40 en su superficie de membrana, niveles que pueden vincularse luego a ciertos síntomas de la enfermedad. Como alternativa, los anticuerpos pueden usarse para inhibir o bloquear la función de OX40 que, a su vez, puede vincularse a la prevención o mejora de ciertos síntomas de la enfermedad, implicando de este modo al OX40 como un mediador de la enfermedad. Esto puede lograrse poniendo en contacto una muestra y una muestra de control con el anticuerpo OX40 en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y OX40. Cualquier complejo formado entre el anticuerpo y OX40 se detecta y compara en la muestra y el control. A la luz de la unión específica de los anticuerpos de la invención para OX40, los anticuerpos de la invención se pueden usar para detectar específicamente la expresión de OX40 en la superficie de las células, por ejemplo, se pueden usar para detectar a un paciente que tiene un bajo nivel de expresión de OX40. Los anticuerpos de la invención también pueden usarse para purificar OX40 mediante purificación por inmutofinidad.
- 15
- 20
- 25 Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método de cribado *in vitro* para detectar un paciente que tiene un bajo nivel de expresión de OX40, que comprende las etapas de:

- (a) purificar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de una muestra de sangre del paciente;
- 30 (b) someter las PBMC al análisis de citometría de flujo; y
- (c) determinar el número de células positivas para OX40 en linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺ y comparar este número con niveles de control.

- En una realización preferida, un bajo nivel de expresión de OX40 está indicado por un aumento en el nivel de expresión de células positivas para OX40 en comparación con niveles de control de hasta el 10%, más preferiblemente de hasta el 20% e incluso más preferiblemente de hasta el 30 %. El enfoque para determinar la expresión de OX40 se describe con más detalle en Kotani A et al., (2001) *Blood*, 98: 3162-4 y Xiaoyan Z et al., (2005) *Clin. Exp. Immunol.* 143: 110-6.
- 35

- 40 En otra realización, los anticuerpos de la invención pueden probarse inicialmente para determinar la actividad de unión asociada con el uso terapéutico o diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden ensayarse usando ensayos de citometría de flujo.

- La presente descripción proporciona además el uso de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo como un medicamento y el uso de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno mediado por OX40. En una realización adicional, la presente descripción proporciona el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo para su uso como un medicamento. También se proporciona por la presente descripción el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo para su uso en un método para tratar un trastorno mediado por OX40. Los trastornos mediados por OX40 son los descritos anteriormente. El anticuerpo antagonista de la presente invención puede ser particularmente útil para tratar trastornos mediados por OX40 independientemente del estado coestimulante de OX40 de un paciente. En una realización preferida, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo puede usarse para tratar un trastorno mediado por OX40 en el que un paciente expresa un bajo nivel de OX40.
- 45
- 50

- 55 Como se ha descrito previamente, los anticuerpos antagonistas OX40 de la invención se pueden coadministrar con uno o más agentes terapéuticos diferentes, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo se puede unir al agente (como un inmunocombinado como se ha descrito anteriormente) o se puede administrar separado del agente. En este último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o concurrentemente con el agente o puede administrarse

conjuntamente con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anticancerosa, por ejemplo, radiación.

- Para la administración del anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 10 mg/kg, del peso corporal del huésped. Un régimen de tratamiento ejemplar implica una administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a seis meses. El anticuerpo usualmente se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensuales, trimestrales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indica midiendo los niveles sanguíneos de anticuerpos con respecto al antígeno diana en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para alcanzar una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunos métodos aproximadamente 25-300 µg/ml. Como alternativa, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o finaliza.
- 20 Los niveles de dosificación reales de los principios activos, es decir, el anticuerpo en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se pueden variar para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del anticuerpo particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados junto con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.
- 30 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo OX40 de la invención preferiblemente da como resultado una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, y/o una prevención del deterioro o incapacidad debida al padecimiento de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para el tratamiento de un trastorno mediado por OX40 puede evaluarse en un sistema de modelo animal que predice la eficacia en seres humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular, dicha inhibición puede medirse *in vitro* mediante ensayos conocidos por el experto en la técnica. Un experto en la técnica podría determinar tales cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición o vía de administración particular seleccionada.
- 40 El anticuerpo o la composición de la presente invención se pueden administrar a través de una o más vías de administración usando uno o más de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración preferidas incluyen intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenterales, por ejemplo, mediante inyección o infusión. Las vías de administración más preferidas son intravenosa o subcutánea. La frase "administración parenteral" como se usa en el presente documento se refiere a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, inyección e infusión subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. Como alternativa, un anticuerpo de la invención se puede administrar a través de una ruta no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o por mucosas, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Artículo de fabricación y kit

- 55 En otra realización de la descripción, se proporciona un artículo de fabricación que comprende el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo, la composición o el inmunoconjugado de la invención para el tratamiento de un trastorno mediado por OX40. El artículo de fabricación puede comprender un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales o jeringas. Los

recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que puede ser eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición puede ser el anticuerpo antagonista descrito en el presente documento. La etiqueta o prospecto puede indicar que la composición puede usarse para tratar la afección de elección, tal como cáncer. En una realización, la etiqueta o prospecto puede indicar que la composición que comprende el anticuerpo antagonista puede usarse para tratar un trastorno mediado por OX40.

Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende el anticuerpo antagonista en el presente documento, y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente terapéutico distinto del anticuerpo antagonista. El artículo de fabricación en esta realización de la descripción puede comprender además un prospecto que indica que la primera y la segunda composiciones se pueden usar en combinación para tratar una enfermedad o trastorno mediado por OX40. Dichos agente terapéutico puede ser cualquiera de las terapias adjuntas descritas en la sección anterior (por ejemplo, un agente trombolítico, un agente antiplaquetario, un agente quimioterapéutico, un agente antiangiogénico, un compuesto antihormonal, un cardioprotector y/o un regulador de la función inmune en un mamífero, incluyendo una citocina). Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFJ), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

También están dentro del alcance de la presente invención los kits que comprenden el anticuerpo, las composiciones o los inmunocombinados de la invención y las instrucciones de uso. El kit puede contener además uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos antagonistas adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo antagonista que tiene una actividad complementaria que se une a un epítipo en el antígeno OX40 distinto del primer anticuerpo antagonista).

Sin más descripción, se cree que un experto en la técnica puede, usando la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos, fabricar y utilizar los agentes de la presente descripción y poner en práctica los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo se proporcionan para facilitar la práctica de la presente descripción, y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera del resto de la descripción.

35 Ejemplos

Ejemplo 1:

40 Generación y cribado de anticuerpos anti-OX40 humano de ratón

Para producir la proteína OX40-Fc humana recombinante, se adquirió un ADNc para el TNFRSF4 humano en imaGenes (número de clon: RZPDB737H0329D; Berlín, Alemania). Este ADNc se usó como plantilla para amplificar por PCR la región codificante de ADN del dominio extracelular de TNFRSF4 humano (SEQ ID NO: 11). En una reacción de PCR separada, la región Fc de una IgG1 humana (posiciones de EU 223-451) se amplificó mediante PCR añadiendo un enlazador 5' GSGGG y un enlazador 3' SA-6xHis y sitios de restricción para la clonación. Los dos productos resultantes se fusionaron entonces usando PCR de extensión solapada con cebadores flanqueantes, añadiendo sitios de restricción para la posterior clonación en un vector de expresión de mamífero modificado basado en el plásmido cDNA3.1 (-) de Invitrogen (Invitrogen AG, Basilea, Suiza, Cat. N.º V795-20), que contenía el promotor CMV humano con el fragmento donante-aceptor de Ig (primer intrón) descrito en la Patente de Estados Unidos 5924939, la secuencia OriP (Koons MD et al., (2001) J Virol. 75(22): 10582-92), el potenciador SV40, y el poliA de SV40 condensado al terminador de gastrina como se describe por Kim D, et al., (2003) Biotechnol. Prog. 19(5): 1620-2. Este plásmido recombinante permitió la expresión del dominio extracelular TNFRSF4 humano - proteína de fusión Fc en células de mamífero con secreción en el medio de cultivo celular dirigido por el péptido señal nativo de la proteína TNFRSF4 humana. Para la producción de proteína recombinante, el vector recombinante mencionado anteriormente se transfirió en células HEK 293 adaptadas a la suspensión (ATCC número CRL 1573) usando reactivo de transfección jetPEI™ (Polyplus-transfection S.A., Strasbourg, Francia, distribuidor: Brunschwig, Basilea, Suiza). El sobrenadante de cultivo celular se recogió después de cinco días y se purificó adicionalmente usando una columna de purificación por afinidad de Proteína A (columna de Sepharose HiTrap Protein A; GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza) operada en un sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza).

Para producir la proteína OX40-his humana recombinante, la región extracelular de TNFRSF4 humano (SEQ ID NO: 11) se amplificó mediante PCR añadiendo un enlazador 3' GSG-6xHis y sitios de restricción para la clonación. El producto de PCR se clonó posteriormente en el plásmido de cDNA3.1 (-) modificado descrito anteriormente. Este plásmido recombinante permitió la expresión de la proteína OX40-his humana en células de mamífero con secreción en los medios de cultivo celular dirigidos por el péptido señal nativo del TNFRSF4 humano. Para la producción de proteínas, el vector recombinante se transfectó en células HEK 293 adaptadas a la suspensión (ATCC número CRL 1573) usando reactivo de transfección jetPEI™ (Polyplus-transfection S.A., Strasbourg, Francia, distribuidor: Brunschwig, Basilea, Suiza). El sobrenadante de cultivo celular se recogió cinco días después de la transfección y se purificó usando una columna de purificación por afinidad de Ni²⁺-NTA (columna de Sepharose HiTrap Ni²⁺-NTA; GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza) operada en un sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza). Se encontró que las proteínas OX40-Fc y OX40-his humanas recombinantes tenían un 95% de pureza según se determinó por SDS-PAGE, y se intercambiaron adicionalmente con tampón en solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de su uso.

La proteína OX40-Fc humana recombinante disuelta en PBS se mezcló con un volumen equivalente de adyuvante Stimune (Prionics, Suiza, ref: 7925000) y se preparó una emulsión. La emulsión se transfirió a jeringas de insulina de 0,5 ml (BD Pharmingen, Allschwil, Suiza) y se inmunizaron por vía subcutánea animales BALB/c (Harlan, Holanda) en las almohadillas traseras, la base de la cola y el cuello con 50 µg de la proteína emulsionada. La inmunización se repitió dos semanas más tarde con la misma cantidad de antígeno y la misma ruta de inyección.

La presencia de anticuerpos anti-OX40 circulantes en los sueros de ratón inmunizados se evaluó mediante ELISA directo usando placas recubiertas con la proteína OX40-his humana recombinante. Se añadió una dilución seriada (de 1:10⁰ a 1:10⁹) de los diferentes sueros de ratón a las placas y se detectaron los anticuerpos unidos usando una molécula entera de H+L de cabra anti-ratón-HRP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza). Se realizó un refuerzo subcutáneo final con 50 µg de antígeno sin adyuvante en animales que presentaban el mejor título sérico de IgG anti-OX40 humano tres días antes del sacrificio.

Los animales se sacrificaron y se recogieron los ganglios linfáticos inguinales, axilares, braquiales, poplíteos y ciáticos para preparar una única suspensión celular alterando la arquitectura de los ganglios linfáticos con dos agujas 25G en una solución de ADNasa (Roche Diagnostics (Schweiz) AG, Rotkreuz, Suiza) y de colagenasa (Roche Diagnostics (Schweiz) AG, Rotkreuz, Suiza). Las suspensiones de células individuales se fusionaron a una línea celular de mieloma X63AG8.653 (línea celular de mieloma BALB/c de ratón; número de acceso ATCC: CRL 1580; Kearney JF et al., (1979) J. Immunol. 123(4): 1548-1550) a una relación de 7:1 (compañero de fusión con respecto a células de los ganglios linfáticos recogidas) con polietilenglicol 1500 (Roche Diagnostics (Schweiz) AG, Rotkreuz, Suiza). Las células fusionadas se colocaron en placas de 96 pocillos de fondo plano que contenían macrófagos de ratón en medio DMEM-10 (Invitrogen AG, Basilea, Suiza) complementado con suero fetal bovino al 10% (FBS, PAA Laboratories, Pasching, Austria), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina (Biochrom AG, Alemania), 100 µg/ml de estreptomina (Biochrom AG, Alemania), HEPES 10 mM (Invitrogen AG, Basilea, Suiza), β-mercaptoetanol 50 µM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza), HAT (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) y factor de crecimiento al 1% (Hybridokine, Interchim/Uptima, Montluçon, Francia).

Aproximadamente 800 pocillos de las fusiones se cribaron mediante ELISA para determinar la presencia de IgG de ratón que reconocía OX40 humano y bloqueaba la unión de OX40L humano en su receptor. Los pocillos positivos se expandieron y se sometieron a dos rondas de subclonación. Las células se recogieron y las cadenas pesada y ligera se clonaron y se secuenciaron.

Ejemplo 2:

50 Clonación y secuenciación de las cadenas VH y VL de los anticuerpos anti-OX40 de células de hibridoma

Para cada hibridoma seleccionado positivamente, se preparó ARN total, se transcribió de forma inversa en ADNc y los genes VH y VL se amplificaron respectivamente mediante PCR. Estos productos de PCR se ligaron en un vector de rescate (vector pDrive, QIAGEN AG, Hombrechtikon, Suiza; Cat. N.º 231124), lo que permite la secuenciación de ADN de productos de PCR individuales y la determinación de mono o policlonalidad de los hibridomas seleccionados. Este vector permitió la selección azul/blanca en placas de LB-agar que contenían IPTG y X-gal (las colonias sin inserto eran azules debido a la degradación de X-gal por el péptido LacZ-α). Se prepararon plásmidos recombinantes de clones bacterianos positivos (color blanco) y se secuenciaron usando cebadores de secuenciación de ADN estándar específicos para la cadena principal del vector (M13rev, M13fwd, T7 o SP6). Las secuencias de

ADN finalmente se subclonaron en un vector de expresión para la expresión recombinante del anticuerpo de interés en células de mamífero.

Aislamiento de ARN.

5 Se aisló el ARN total de $2 \cdot 10^6$ células usando el RNeasy Mini Kit de QIAGEN (QIAGEN AG, Hombrechtikon, Suiza; Cat. N.º 74106) de acuerdo con el protocolo del fabricante; las muestras se cuantificaron usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (WITEC AG, Littau, Suiza).

10 RT-PCR de una etapa

Las preparaciones de ARN total descritas anteriormente se transcribieron de forma inversa adicionalmente en ADNc, y los fragmentos VH y VL se amplificaron por PCR usando dos mezclas diferentes de cebadores degenerados, permitiendo cada uno la recuperación de todas las diferentes subfamilias de fragmentos variables de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón y regiones de unión de cadena pesada variables o la recuperación de todos los fragmentos variables kappa de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón y regiones de unión kappa de cadena ligera variables. Los cebadores usados para la transcripción inversa y la amplificación se sintetizaron por Microsynth (Balgach, Suiza), y se purificaron por HPLC (Tablas 1-4). Tanto la transcripción inversa como la amplificación por PCR se realizaron simultáneamente usando el kit de RT-PCR de una etapa QIAGEN (QIAGEN AG, Hombrechtikon, Suiza; Cat. N.º 210212). Dado que la técnica usó cebadores específicos, cada muestra de ARNm se trató luego por duplicado, permitiendo la transcripción inversa individual y la amplificación de los fragmentos VH o VL. Se mezclaron 2 µg de ARN total disuelto en agua libre de RNasa hasta un volumen final de 30 µl con: 10 µl de una solución madre 5x de tampón OneStep RT-PCR QIAGEN, 2 µl de una mezcla dNTPs a una concentración de 10 mM, 3 µl de mezcla de cebadores a una concentración de 10 µM y 2 µl de mezcla enzimática OneStep RT-PCR QIAGEN. La mezcla final se colocó luego en un tubo de PCR y se cicló en un termociclador de PCR (BioRad iCycler versión 4.006, Bio-Rad Laboratories AG, Reinach, Suiza) usando los siguientes ajustes:

	30 min a 50 °C
	15 min a 95 °C
40 ciclos:	30 s a 94 °C
	30 s a 55 °C
	1 min a 72 °C
	10 min a 72 °C
	Mantendimiento a 4 °C

Clonación pDrive

30 Los productos de PCR se procesaron sobre geles de agarosa al 2%. Después de la electroforesis de ADN, los fragmentos de interés (~450 pb) se escindieron de los geles de agarosa, y se extrajeron adicionalmente usando el kit 250 de Macherey-Nagel NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Oensingen, Suiza; Cat. N.º 740609,250). Para la secuenciación del ADN, los productos de PCR extraídos se clonaron en el vector de rescate descrito anteriormente (vector pDrive, QIAGEN AG, Hombrechtikon, Suiza; Cat. N.º 231124) y se transformaron en la cepa TOP10 de *E. coli* (Invitrogen AG, Basilea, Suiza; Cat. N.º C404006)

Extracción Miniprep

40 Las colonias positivas se cultivaron durante una noche a 37 °C (agitación a 250 RPM) en 1,5 ml de medio Luria Bertani (LB) complementado con 100 µg/ml de ampicilina sembrada en placas de bloque de pocillos Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, Oensingen, Suiza; Cat. N.º 740488,24). Al día siguiente, se realizaron extracciones de ADN miniprep usando el kit de plásmidos NucleoSpin Multi-8 (Macherey-Nagel, Oensingen, Suiza; Cat. N.º 740620,5).

45 Secuenciación y análisis de secuencia

Se enviaron muestras para la secuenciación de ADN a la empresa de servicios de secuenciación de ADN Fasteris

(Plan-les-Ouates, Suiza). Se usaron los cebadores estándar: M13rev, M13fwd, T7, SP6 (Tabla 5). Para analizar las secuencias de ADN, se usaron el Clone Manager 9 Professional Edition (Scientific & Educational Software, NC, Estados Unidos) y el BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, TA (1999) Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98).

5 Clonación del vector de expresión para la expresión del anticuerpo quimérico recombinante

Para la expresión recombinante en células de mamífero, los fragmentos VH y VL murinos aislados se formatearon como inmunoglobulinas quiméricas usando métodos de PCR basados en ensamblaje. Estos anticuerpos quiméricos consisten en una cadena pesada donde el dominio variable de cadena pesada murina se fusiona con los dominios constantes de cadena pesada de IgG1 humana (regiones $\gamma 1$, bisagra, $\gamma 2$ y $\gamma 3$) y una cadena ligera donde el dominio variable de la cadena ligera murina se fusiona a un dominio constante kappa humano ($\text{C}\kappa$). Las partes constantes humanas y variables murinas ensambladas por PCR se clonaron posteriormente en un vector de expresión de mamífero modificado basado en el vector ADNc3.1(-) modificado de Invitrogen mencionado en el Ejemplo 1 con la diferencia de que se empleó un péptido líder kappa de cadena ligera de inmunoglobulina humana para dirigir la secreción de proteínas. Para la producción de proteínas de los candidatos de inmunoglobulina, se cotransfectaron cantidades iguales de ADN del vector de cadena pesada y ligera en HEK-293 adaptadas a la suspensión (número ATCC: CRL-1573). El sobrenadante de cultivo celular se recogió después de cinco días y se purificó usando una columna de purificación por afinidad de Proteína A (columna de Sepharose HiTrap Protein A) operada en un sistema ÄKTA FPLC (ambos de GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza).

Tabla 1: Mezcla de cebadores VH - inverso

GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTR MAG CTT CAG GAG TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTB CAG CTB CAG CAG TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTG CAG CTG AAG SAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTC CAR CTG CAA CAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAG CTB CAG CAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAR CTG CAG CAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAC GTG AAG CAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAS STG GTG GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAV GTG AWG STG GTG GAG TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAG STG GTG GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTG CAM CTG GTG GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG CTG ATG GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAR CTT GTT GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAR GTR AAG CTT CTC GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAA GTG AAR STT GAG GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTT ACT CTR AAA SAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAA CTV CAG CAR CC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAT GTG AAC TTG GAA SAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG GTC ATC GAR TC

Tabla 2: Mezcla de cebadores VH - directo

CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA AAC GGT GAC CGT GGT
CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT
CCTCCACCACTCGAGCC CGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT
CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT

Tabla 3: Mezcla de cebadores VL - inverso

GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATC CAG CTG ACT CAG CC
GGCGGTGGC GCT AGC CAA ATT GTT CTC ACC CAG TC
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG MTM ACT CAG TC
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG YTR ACA CAG TC

GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTR ATG ACM CAG TC
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT MAG ATR AMC CAG TC
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT CAG ATG AYD CAG TC
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATY CAG ATG ACA CAG AC
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTT CTC AWC CAG TC
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GWG CTS ACC CAA TC
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT STR ATG ACC CAR TC
GGCGGTGGC GCT AGC GAY RTT KTG ATG ACC CAR AC
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG ATG ACB CAG KC
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATA ACY CAG GA
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACC CAG WT
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACA CAA CC
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT TTG CTG ACT CAG TC
GGCGGTGGC GCT AGC GAA ACA ACT GTG ACC CAG TC
GGCGGTGGCGCT AGC GAA AAT GTK CTS ACC CAG TC
GGCGGTGGCGCT AGC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TC

5

Tabla 4: Mezcla de cebadores VL - directo

ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT KAT TTC CAG CTT GG T
ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT TAT TTC CAA CTT TG T
ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT CAG CTC CAG CTT GG T
ATGCTGAC GC GGC CGC ACC TAG GAC AGT CAG TTT GGT

Tabla 5: Cebadores de secuenciación

M13-Directo	GTAAAACGACGGCCAGT
M13-Inverso	AACAGCTATGACCATG
T7	TAATACGACTCACTATAGG
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG

Ejemplo 3:**5 Caracterización biológica de anticuerpos anti-OX40 humano**ELISA de detección de anticuerpos específicos de OX40:

Los títulos de anticuerpos, la especificidad y la producción por hibridomas y los candidatos de anticuerpos recombinantes se determinaron mediante un ELISA directo. Brevemente, placas de 96 pocillos de microtitulación (Costar USA, distribuidor VWR AG, Nyon, Suiza) se recubrieron con 100 µl de OX40-his humana recombinante a 2 µg/ml en PBS (véase el Ejemplo 1 para la generación de la proteína OX40-his). Las placas se incubaron durante una noche a 4 °C y luego se bloquearon con PBS BSA al 2% (albúmina sérica bovina, PAA Laboratories, Pasching, Austria) a temperatura ambiente (TA) durante una hora. La solución de bloqueo se eliminó y se añadieron los sobrenadantes de hibridoma o anticuerpos purificados. Las placas se incubaron entonces a TA durante 30 minutos, luego se lavaron nueve veces con PBS Tween-20 al 0,01% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) y se añadió un anticuerpo de detección anti-ratón H+L de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) a una dilución de 1:1000. Para detectar anticuerpos quiméricos recombinantes (véase el Ejemplo 2) que poseen un Fc humano, se usó un anticuerpo de IgG de conejo antihumano marcado con HRP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) a una dilución de 1:1000 como anticuerpo de detección. Las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA), se lavaron nueve veces con PBS Tween-20 al 0,01 % y se añadió el sustrato de TMB (Bio-rad Laboratories AG, Reinach, Suiza) a las placas, y la reacción se detuvo después de seis minutos añadiendo H₂SO₄. La absorbancia se leyó entonces a 450 nm por un lector de microplacas (Biotek, Estados Unidos; distribuidor: WITTEC AG, Littau, Suiza). La figura 1A muestra que el anticuerpo 1D4 quimérico y el anticuerpo 2F8 quimérico reconocen la proteína recubierta con OX40-His.

ELISA de bloqueo de OX40L:

La proteína ligando OX40 humana recombinante (OX40L) se generó como se indica a continuación: el ADNc para TNFSF4 humano (nombre de clon: IOH46203) se adquirió de imaGenes (Berlín, Alemania) y la porción extracelular (aminoácidos 51-183) del ligando TNFSF4 humano (numeración según la secuencia de Uniprot Q6FGS4) se amplificó con sitios de restricción flanqueantes. El producto de PCR resultante que incluía un enlazador ASA y una secuencia de etiqueta 8-His en su extremo 5' se clonó posteriormente en una versión modificada del vector pREP4 de Invitrogen (Invitrogen AG, Basilea, Suiza) que portaba un promotor CMV, una hormona de crecimiento bovino de poliadenilación, y el péptido líder VJ2C murino para dirigir la secreción de la proteína recombinante. Para la producción de proteínas recombinantes, el vector recombinante se transfeció en células HEK 293 adaptadas a la suspensión (ATCC número CRL 1573) usando reactivo de transfección jetPEI™ (Polyplus-transfection S.A., Strasbourg, Francia, distribuidor: Brunschwig, Basilea, Suiza). El sobrenadante de cultivo celular se recogió después de cinco días y se purificó usando una columna de purificación por afinidad de Proteína A (columna de Sepharose HiTrap Protein A; GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza) operada en un sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza).

Para determinar si los anticuerpos anti-OX40 generados pueden bloquear la unión de OX40L al receptor OX40, se desarrolló un ELISA de bloqueo. Se recubrieron placas de microtitulación de noventa y seis pocillos (Costar, Estados Unidos; distribuidor VWR AG, Nyon, Suiza) con 100 µl de OX40-Fc humano recombinante (véase el Ejemplo 1) a 2 µg/ml en PBS. Las placas se incubaron durante una noche a 4 °C y luego se bloquearon con PBS BSA al 2% a TA durante una hora. La solución de bloqueo se eliminó y se añadieron los sobrenadantes de hibridoma o anticuerpos purificados a la placa. Cinco minutos más tarde, se añadieron 50 µl de OX40L humano recombinante biotinilado a 0,04 mg/ml a cada pocillo. Las placas se incubaron a TA durante 60 minutos, luego se lavaron nueve veces con PBS Tween-20 al 0,01 % y se añadió HRP-estreptavidina (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) a una dilución de 1:2000. Las placas se incubaron durante 30 minutos a TA, se lavaron 9 veces con PBS Tween-20 al 0,01 % y se añadió el sustrato de TMB (Bio-rad Laboratories AG, Reinach, Suiza) a las placas, y la reacción se detuvo después de 6 minutos añadiendo H₂SO₄. La absorbancia se leyó entonces a 450 nm por un lector de microplacas (Biotek, Estados Unidos; distribuidor: WITTEC AG, Littau, Suiza). La figura 1B muestra que el anticuerpo 1D4 quimérico es capaz de bloquear la interacción entre OX40 y OX40L de una manera dependiente de la dosis, mientras que el

anticuerpo 2F8 quimérico no puede bloquear la interacción entre OX40 y OX40L.

Reacción de linfocitos mixtos humanos (MLR)

- 5 Se recogió sangre de dos donantes diferentes en tres S-Monovette de 10 ml con citrato como anticoagulante (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). Las células del donante N.º 1 se usaron como células efectoras, mientras que las células del donante N.º 2 se usaron como células diana. Las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de los 2 donantes se purificaron usando tubos de filtro de separación de sangre de 50 ml (distribuidor: Brunswick, Basilea, Suiza) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron 2 veces con medio Roswell Park
- 10 Memorial Institute (RPMI, PAA Laboratories, Pasching, Austria) sin FBS. Las células diana se incubaron con 50 µg/ml de mitomicina C (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) durante 30 minutos a 37 °C. Las células se lavaron entonces 3 veces con RPMI sin FBS y se suspendieron de nuevo a 1×10^6 células/ml en RPMI, FBS al 10 % (PAA Laboratories, Pasching, Austria), L-glutamina 2 mM (Lonza, Lovaina, Bélgica), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina (Biochrom AG, Berlín, Alemania). En microplacas de 96 pocillos de fondo en U (TPP,
- 15 Trasadingen, Suiza), se distribuyeron 50.000 células diana y 80.000 células efectoras en un volumen final de 100 µl a cada pocillo. Se añadieron cien µl de diluciones de anticuerpo a los pocillos. Las placas se incubaron durante 7 días a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5%. Siete días después del comienzo de la MLR, las células se pulsaron con 0,5 µCi de ³H timidina (Perkin Elmer). 18 horas después del pulso, las células se recogieron y la radioactividad incorporada se cuantificó en un contador beta de Wallac. La figura 2 muestra que el anticuerpo 1D4 quimérico es
- 20 capaz de bloquear la MLR de una manera dependiente de la dosis en un grado más alto que el control positivo.

Ejemplo 4:

- La unión de anticuerpos anti-OX40 humano en seres humanos y otras especies animales activó las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por citometría de flujo**
- 25

Células humanas

- Se recogieron los filtros que contenían leucocitos humanos del Blood Collection Center de La Chaux-de-Fonds,
- 30 Suiza (Centre de Transfusion Sanguine et Laboratoire de Sérologie, rue Sophie-Mairet 29, CH-2300). Las células se eliminaron de los filtros mediante contraflujo con 60 ml de PBS que contenía 10 U/ml de licuamina (Drossapharm AG, Lucern, Suiza). Las PBMC se purificaron con tubos de filtro de separación sangre de 50 ml (distribuidor: Brunswick, Basilea, Suiza) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron 3 veces con medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, PAA Laboratories, Pasching, Austria) con FBS (PAA Laboratories, Pasching,
- 35 Austria). Las células se suspendieron de nuevo a 3×10^6 células/ml en RPMI, FBS al 10% (PAA Laboratories, Pasching, Austria), Ultraglutamina 2 mM (Lonza, Lovaina, Bélgica), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina (Biochrom AG, Berlín, Alemania), 10 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) + 100 U/ml de IL-2 rHu (Proleukin, Novartis, Basilea, Suiza) en una placa de 24 pocillos (TPP, Trasadingen, Suiza). Cuarenta y ocho horas más tarde, las células se recogieron y se analizaron mediante citometría
- 40 de flujo como se describe a continuación.

- Se cultivaron células HPB-ALL (línea celular de leucemia linfocítica aguda T, de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania) en RPMI, FBS al 10%. Se distribuyeron 2×10^5 células en una placa con fondo en V de 96 pocillos (TPP, Trasadingen, Suiza), y se centrifugaron durante tres
- 45 minutos a 1300 rpm; los sobrenadantes se descartaron, las células se recogieron y se analizaron mediante citometría de flujo como se describe a continuación.

- Las células PBMC y HPB-ALL preparadas como se ha descrito anteriormente se suspendieron de nuevo en 50 µl de tampón FACS (PBS, FBS al 2%, Versene al 10% (Invitrogen, Estados Unidos) con 5 µg/ml de anticuerpo 1D4
- 50 quimérico o 5 µg/ml o control de isotipo apropiado o 20 µl de un anticuerpo anti-OX40 humano comercial marcado con PE (clon L106, BD Biosciences, Allschwil, Suiza). Las células se incubaron durante 30 minutos en hielo, se lavaron dos veces y se suspendieron de nuevo en 50 µl de tampón FACS. Para detectar el anticuerpo 1D4 quimérico y el anticuerpo de control de isotipo se usó una IgG-Ficoeritrina-PE anti-humana (BD Biosciences, Allschwil, Suiza) diluida 1/200. Se incubaron las células durante 15 minutos en hielo, se lavaron una vez, se suspendieron de nuevo
- 55 en 400 µl de tampón FACS y se analizaron en el instrumento FACS (Cyan, Beckman Coulter International S.A., Nyon, Suiza).

Células primarias de mono Cynomolgus

Se recogió sangre entera de monos Cynomolgus (obtenidos del profesor Eric Rouiller, Laboratory of Neurophysiology, University of Fribourg, Friburgo, Suiza) en tubos de citrato (BD Biosciences, Allschwil, Suiza). Se mezclaron dos ml de PBS con 3 ml de sangre y la mezcla se dispuso en capas sobre la parte superior de 10 ml de una mezcla 85:15 de Ficoll:PBS (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza). Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a temperatura ambiente sin interrupción. La capa de PBMC se recogió y se lavó tres veces con PBS. Las células se suspendieron de nuevo a 3×10^6 células/ml en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, PAA Laboratories, Pasching, Austria), FBS al 10% (PAA Laboratories, Pasching, Austria), aminoácidos no esenciales (PAA Laboratories, Pasching, Austria), Piruvato sódico 1 mM (PAA Laboratories, Pasching, Austria), Ultraglutamina 2 mM (Lonza, Bélgica), 100 U/ml de penicilina (Biochrom AG, Alemania), 100 µg/ml de estreptomina (Biochrom AG, Alemania). Se distribuyó un ml de la suspensión celular en una placa de 24 pocillos (TPP, Trasadingen, Suiza) y se añadieron 10 µg/ml de PHA (PHA/M, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza), 100 U/ml de IL-2 rHu (Proleukin, Novartis, Basilea, Suiza). Las células se incubaron durante 50 horas a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5%. Se recogieron PBMC activadas y se suspendieron de nuevo en PBS/FBS al 2,5% (tampón FACS). Cincuenta mil células en 50 µl de tampón FACS se distribuyeron en una placa con fondo en V de 96 pocillos y se añadieron anticuerpo anti OX40 humano-1D4 quimérico biotinilado o anticuerpo de control de isotipo biotinilado o anti-OX40 humano biotinilado comercial formulado en ovejas (BD Biosciences, Allschwil, Suiza) a los pocillos a 25 µg/ml. Las muestras se incubaron durante 20 minutos en hielo, luego las células se lavaron dos veces con tampón FACS frío y luego se incubaron con Estreptavidina-PE (BD Biosciences, Allschwil, Suiza) a una dilución de 1:20 durante 15 minutos en hielo. Las células se lavaron una vez con tampón FACS y luego se suspendieron de nuevo en 300 µl de tampón FACS. Se añadió yoduro de propidio a un volumen de 2 µl (PI; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) en cada muestra para excluir las células muertas. Las células se analizaron por citometría de flujo (Cyan, Beckman Coulter International S.A., Nyon, Suiza).

Las figuras 3A y 3B muestran que el anticuerpo 1D4 quimérico es capaz de reconocer OX40 expresado en la superficie de linfocitos activados humanos y de mono cynomolgus, respectivamente, proporcionando de este modo propiedades de reactividad cruzada altamente deseadas para el desarrollo de fármacos.

30 Ejemplo 5:**Constantes de afinidad de unión cinética del anticuerpo 1D4 quimérico para el dominio extracelular del receptor OX40 humano por resonancia de plasmón superficial (SPR)**

Se midieron las constantes de afinidad de unión cinética (KD) en el anticuerpo capturado de proteína A usando el dominio extracelular del receptor OX40 humano etiquetado con histidina recombinante como se describe en el Ejemplo 1 como analito. Las mediciones se realizaron en un BIAcore 2000 (GE Healthcare - BIAcore, Uppsala, Suecia) a temperatura ambiente, y se analizaron con el software BiaEvaluation (BIAcore; v4.1).

Se activó un chip sensor de grado de investigación CM5 (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza; BR-1000-14) inyectando 35 µl de una solución 1:1 de N-hidroxisulfosuccinimida (NHS)/clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) (v/v; caudal de 5 µl/min; en las rutas de flujo 1 y 2). La proteína A (ref. P7837; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) se diluyó a una concentración final de 50 µg/ml en tampón acetato pH 4,5 (GE, BR-1003-50; una unidad de pH por debajo de pl) y posteriormente se inmovilizó en el chip sensor CM5 activado previamente inyectando 35 µl en ambas rutas de flujo 1 y 2 (5 µl/min); esto correspondió a aproximadamente 1500 unidades de respuesta (RU). El chip sensor de proteína A CM5 se desactivó entonces inyectando 35 µl de solución de etanolamina (5 µl/min). Finalmente, se realizaron dos inyecciones de 10 µl de solución de glicina (GE, ref. BR-1003-54; 10 mM, pH 1,5) para liberar moléculas de proteína A no entrecruzadas.

Antes de las mediciones de afinidad, se realizó una prueba de limitación de transferencia de masa inyectando una concentración fija de analito en una cantidad fija de anticuerpo capturado de proteína A a diferentes caudales (5, 15, 30, 50, 75 µl/min durante 2 minutos). El análisis de las pendientes de asociación a diferentes caudales indicó la transferencia de masa.

Para las mediciones de afinidad, el anticuerpo 1D4 quimérico almacenado en 1 x tampón PBS se diluyó hasta una concentración final de 15 nM en tampón HBS-EP (GE, ref. BR-1001-88; Hepes 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005%, pH 7,4). 10 µl de esta reserva diluida se inyectaron posteriormente en la ruta de flujo 2 del chip de proteína A CM5 (30 µl/min) para alcanzar 200-250 RU. Después de esta etapa de captura, el dominio extracelular del receptor OX40 humano etiquetado con histidina recombinante se inyectó a diferentes

concentraciones (50 nM a 0,4 μ M) en la ruta de flujo 1 y 2 (ruta de flujo 1 utilizada como referencia) a 30 μ l/min de caudal. Después de cada evento de unión, la superficie se regeneró con tampón de glicina a pH 1,5 inyectado durante 1 min (10 μ l/min).

5 Las mediciones (sensorgrama: fc2-fc1) se ajustaron mejor con un modelo de analito bivalente 2:1 con transferencia de masa. Para tener en cuenta las variaciones experimentales en el anticuerpo capturado de proteína A al comienzo de cada medición, el valor $R_{\text{máx}}$ se estableció en local en todos los ajustes. Los tiempos de disociación fueron de al menos 300-600 segundos. Las mediciones se realizaron por duplicado e incluyeron muestras de concentración nula por referencia. El valor de χ^2 representa la suma de las diferencias cuadráticas entre los datos experimentales y
10 los datos de referencia en cada punto; mientras que los gráficos de productos residuales indican la diferencia entre los datos experimentales y de referencia para cada punto del ajuste. Tanto χ^2 como los valores residuales se usaron para evaluar la calidad de un ajuste entre los datos experimentales y los modelos de enlace individuales.

Se realizaron mediciones por duplicado con el anticuerpo 1D4 anti-OX40 humano quimérico inmovilizado en el chip
15 sensor de proteína A y el dominio extracelular del receptor OX40 humano etiquetado con histidina recombinante como analito. El valor de KD estaba entre 91 y 116 nM con valores de $\chi^2 < 1,25$.

Ejemplo 6:

20 Humanización del anticuerpo monoclonal de ratón 1D4

Se describe en el presente documento la humanización del anticuerpo 1D4 de ratón anti-OX40 humano que incluye la selección de marcos aceptores humanos, retromutaciones, y mutaciones que conservan y/o mejoran sustancialmente las propiedades de unión de marcos aceptores injertados con CDR humanos.

25

Diseño de las regiones variables reformadas

Se usó la correspondencia de homología para elegir marcos aceptores humanos para injertar CDR de 1D4. Pueden usarse bases de datos, por ejemplo, una base de datos de genes variables de la línea germinal de los loci de
30 inmunoglobulina de ser humano y ratón (la base de datos IMGT (el international ImMunoGeneTics information system®; Lefranc MP et al., (1999) Nucleic Acids Res. 27(1): 209-12; Ruiz M et al., (2000) Nucleic Acids Res. 28(1): 219-21; Lefranc MP (2001) Nucleic Acids Res. 29(1): 207-9; Lefranc MP (2003) Nucleic Acids Res. 31(1): 307-10; Lefranc MP et al., (2005) Dev. Comp. Immunol. 29(3): 185-203; Kaas Q et al., (2007) Briefings in Functional Genomics & Proteomics, 6(4): 253-64) o la VBASE2 (Retter I et al., (2005) Nucleic Acids Res. 33, Base de datos
35 edición D671-D674) o la base de datos de Kabat (Johnson G et al., (2000) Nucleic Acids Res. 28: 214-218)) o publicaciones (por ejemplo, Kabat EA *et al.*, anteriormente) para identificar las subfamilias humanas a las que pertenecen las regiones V de cadena pesada y ligera murinas y determinar el marco de línea germinal humano mejor ajustado para usar como la molécula aceptora. La selección de secuencias variables de cadena pesada y ligera (VH y VL) dentro de estas subfamilias para su uso como aceptor puede basarse en la homología de secuencia y/o una
40 correspondencia de estructura de las regiones CDR1 y CDR2 para ayudar a conservar la presentación relativa apropiada de las seis CDR después del injerto.

Por ejemplo, el uso de la base de datos IMGT indica buena homología entre el marco de dominio variable de cadena pesada 1D4 y los miembros de la subfamilia de dominio variable de cadena pesada humana 2. Se observaron
45 homologías e identidades más altas de tanto CDR como secuencias marco para secuencias de línea germinal: IGHV 2-70*10 (SEQ ID NO: 19), IGHV2-70*01 (SEQ ID NO: 20), IGHV2-70*13 (SEQ ID NO: 21), IGHV2-5*09 (SEQ ID NO: 22), e IGHV2-70*11 (SEQ ID NO: 23), cada una de las cuales tiene una identidad de secuencia superior al 73% para toda la secuencia hasta CDR3. IGHV 2-70*10, IGKV2-70*01, e IGHV2-70*13 tienen una identidad de secuencia del 74%; mientras que IGHV2-5*09, e IGHV2-70*11 tienen una identidad de secuencia del 73,5% y del 73%,
50 respectivamente.

Usando el mismo enfoque, la secuencia de dominio variable de cadena ligera 1D4 mostró buena homología con los miembros de la subfamilia 3 kappa de dominio variable de cadena ligera humana. Se observaron homologías e
55 identidades más altas de tanto CDR como secuencias marco para secuencias de línea germinal: IGHV3-11*01 (SEQ ID NO: 24) (65,3% de identidad), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25) (64,9% de identidad), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26) (64,9% de identidad), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) (64,2% de identidad), e IGHV3-20*01 (SEQ ID NO: 28) (62,5% de identidad).

Como punto de partida para el proceso de humanización, los dominios variables humanos de IGHV 2-70*10 (SEQ ID

NO: 19), e IGHV3-11*01 (SEQ ID NO: 24) se seleccionaron como aceptores para las CDR de 1D4. IGHV 2-70*10 se seleccionó sobre otros dominios variables de cadena pesada humana por su superior homología con 1D4 en su región marco.

5 Se preparó un primer anticuerpo humanizado de isotipo gamma humano 1 (véase a continuación). El anticuerpo incluía un dominio variable de cadena pesada híbrido de humano-ratón y un dominio variable de cadena ligera híbrido de humano-ratón. El dominio variable de cadena pesada híbrida se basó en el dominio variable de cadena pesada humana IGHV 2-70*10 en el que CDR1 y 2 de la línea germinal se reemplazaron respectivamente por CDR1 y 2 de cadena pesada de 1D4. La mejor correspondencia de la secuencia del segmento JH con respecto al marco
 10 aceptor humano se identificó a partir de las búsquedas IMGT mencionadas anteriormente. La secuencia variable de cadena pesada híbrida de humano-ratón resultante que tiene regiones marco IGHV 2-70*10 humanas, CDR de ratón 1D4, y la mejor correspondencia de JH con el aceptor humano se denomina en el presente documento como dominio variable de cadena pesada VH1 con SEQ ID NO: 29. De forma similar, el dominio variable de cadena ligera híbrida de humano-ratón usado para este primer candidato de anticuerpo humanizado tenía regiones marco IGKV3-
 15 11*01 humanas, CDR de ratón 1D4, y la mejor correspondencia de JK con el aceptor humano, y se denomina en el presente documento como dominio variable de cadena ligera VL1 con SEQ ID NO: 30. El primer anticuerpo humanizado que incluye VH1 y VL1 se abrevia en el presente documento anticuerpo VH1/VL1.

Producción del primer prototipo de anticuerpo humanizado

20 Las secuencias de ADN codificante (ADNc) para VH1 y VL1 se sintetizaron en un formato scFv por GENEART AG (Regensburg, Alemania) permitiendo de este modo que una única secuencia de ADN incluya ambos dominios variables (SEQ ID NO: 31). Los ADNc de dominio variable individuales se recuperaron de esta construcción de scFv mediante PCR, y se ensamblaron adicionalmente aguas arriba de su secuencia o secuencias de ADNc de dominio
 25 constante respectivas usando técnicas de ensamblaje de PCR. Finalmente, los ADNc de cadena pesada y ligera completos se ligaron en vectores independientes que se basan en un vector pcDNA3.1 modificado (Invitrogen, CA, Estados Unidos) que lleva el promotor CMV y una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. El vector específico de cadena ligera permitió la expresión de cadenas ligeras de isotipo kappa humano por ligación del ADNc de dominio variable de cadena ligera de interés frente al ADNc de dominio constante de cadena ligera kappa
 30 usando los sitios de enzima de restricción BamHI y BsiWI; mientras que el vector específico de la cadena pesada se diseñó para permitir la ligación del ADNc de dominio variable de cadena pesada de interés frente a la secuencia de ADNc que codifica los dominios constantes humanos de CH1 de IGHG1, de la región bisagra de IGHG1, CH2 de IGHG1 y CH3 de IGHG1 usando los sitios de enzima de restricción BamHI y Sall. Tanto en los vectores de expresión de cadena pesada como ligera, la secreción se dirigió por el péptido líder VJ2C de ratón que contenía el sitio BamHI.
 35 El sitio de enzima de la restricción BsiWI está situado en el dominio constante kappa; mientras que el sitio de la enzima de restricción Sall se encuentra en el dominio CH1 de IGHG1.

El anticuerpo VH1/VL1 se produjo transitoriamente mediante cotransfección de cantidades equivalentes de vectores de cadenas pesadas y ligeras en células HEK293-EBNA1 adaptadas en suspensión (número de catálogo de
 40 ATCC®: CRL-10852) usando polietilenimina (PEI, Sigma, Buchs, Suiza). Típicamente, se transfectan 100 ml de células en suspensión a una densidad de 0,8-1,2 millones de células por ml con una mezcla de ADN-PEI que contiene 50 µg de vector de expresión que codifica la cadena pesada y 50 µg de vector de expresión que codifica la cadena ligera. Cuando se introducen vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpos en las células huésped, se producen anticuerpos cultivando adicionalmente las células durante un período de 4 a 5 días
 45 para permitir la secreción en el medio de cultivo (EX-CELL 293, medio sin suero de HEK293 Sigma, Buchs, Suiza), complementado con ácido plurónico al 0,1%, glutamina 4 mM y 0,25 µg/ml de geneticina).

El anticuerpo VH1/VL1 se purificó a partir del sobrenadante libre de células usando medio de línea de corriente de proteína A recombinante (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza), y se cambió con tampón en una
 50 solución salina tamponada con fosfato antes de los ensayos. La unión a OX40 humano se midió por SPR como se ha descrito en el Ejemplo 5.

Retromutaciones de marcos humanos injertados

55 Dado que el injerto directo de CDR a partir de anticuerpo de ratón 1D4 condujo a un candidato que no tenía unión con OX40 humano (Tabla 6 y figura 4), se inició la mutagénesis en la que los restos humanos se sustituyen por residuos de ratón. Este proceso se denomina retromutación y es el procedimiento más impredecible en la humanización de los anticuerpos monoclonales. Se necesita la identificación y la selección de restos marco críticos del anticuerpo de ratón que han de conservarse para preservar la afinidad mientras que al mismo tiempo se

minimiza la inmunogenicidad potencial en el anticuerpo humanizado. La Tabla 7, la Tabla 8 y la figura 5 muestran residuos (numeración de Kabat) que difieren entre los marcos de anticuerpos de ratón y humanos. Los residuos que pueden afectar a las conformaciones de las CDR o el empaquetamiento del dominio intervariable son de particular interés, ya que estos pueden tener el mayor impacto sobre la afinidad del anticuerpo.

5

Para identificar residuos que pueden afectar a la mayoría de la conformación de CDR y/o el empaquetamiento del dominio intervariable, se calculó un modelo tridimensional para el par VH1-VL1 de dominios variables utilizando el servidor de modelado de homología de estructura SWISS-MODEL (Arnold K et al., (2006) Bioinformatics, 22(2): 195-201; <http://swissmodel.expasy.org>) configurado en modo automático. El análisis del modelo permitió la selección de un subconjunto de posiciones en función de su influencia putativa en las regiones CDR y/o el empaquetamiento del dominio variable de cadena pesada-cadena. Este subconjunto de posiciones consistía en posiciones variables de cadena pesada: 23, 35b, 48, 50, 60 y 62, así como posiciones variables de cadena ligera: 1, 33, 34, 46, 47, 54, 56, y 71 (numeración de Kabat). Además de estas retromutaciones, la posición de la cadena ligera Y31 encontrada en el anticuerpo VH1/VL1 se eliminó en algunos candidatos

10

15

Se prepararon candidatos humanizados adicionales basados en diversas combinaciones de sustituciones de cadena pesada y ligera en el contexto de la secuencia de anticuerpo VH1/VL1 usando mutagénesis estándar y métodos descritos anteriormente. Los candidatos de anticuerpos humanizados se analizaron en cuanto a su afinidad de unión por SPR como se ha descrito en el Ejemplo 5.

20

Los rendimientos de producción y las propiedades de unión de algunos de los anticuerpos humanizados basados en esta única sustitución o combinación de sustituciones se muestran en la Tabla 6. De los 28 anticuerpos mostrados, nueve candidatos no mostraron ninguna unión al OX40 humano, y otro grupo de nueve tuvo una unión de débil a mala. Los anticuerpos humanizados basados en VL9 mostraron la unión de más consistente a débil al OX40 humano mediante SPR. Solo dos anticuerpos, VH6/VL9 y VH7/VL9 mostraron buena unión al OX40 humano. Ambos anticuerpos humanizados tenían retromutaciones en posiciones variables de cadena pesada: 23, 35b, 50, 60 y 62 y posiciones variables de cadena ligera: 33, 34, 46, 47 y 71 (numeración de Kabat). Además de estas retromutaciones, tanto VH6/VL9 como VH7/VL9 se beneficiaron de la eliminación de la posición de cadena ligera 31. Sorprendentemente, VH7/VL9 tenía una afinidad mejorada por el OX40 humano sobre el anticuerpo quimérico 1D4 y la variante VH6/VL9. Las afinidades de unión de estos anticuerpos humanizados se resumen en la Tabla 9.

25

30

Termostabilidad de anticuerpos anti-OX40 humanizados seleccionados mediante calorimetría diferencial de barrido

Las estabildades térmicas de los anticuerpos humanizados se midieron usando calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los perfiles de fusión de anticuerpos monoclonales son característicos de sus isotipos (Garber E & Demarest SJ (2007) Biochem. Biophys. Res. Commun. 355: 751-7), sin embargo, la temperatura de fusión en el punto medio del fragmento FAB puede identificarse fácilmente incluso en el contexto de una IgG de longitud completa. Tal fusión en el punto medio de la porción FAB se usó para controlar la estabilidad monoclonal de los candidatos humanizados.

35

40

Las mediciones calorimétricas se realizaron en un microcalorímetro de barrido diferencial VP-DSC (MicroCal, Northampton, Reino Unido). El volumen celular fue de 0,128 ml, la velocidad de calentamiento fue de 200 °C/h, y el exceso de presión se mantuvo a 65 p.s.i. Todos los anticuerpos se usaron a una concentración de 1 mg/ml en PBS (pH 7,4). La capacidad calorífica molar del anticuerpo se estimó por comparación con muestras duplicadas que contenían un tampón idéntico del que se había omitido el anticuerpo. Las capacidades caloríficas molares parciales y las curvas de fusión se analizaron usando procedimientos estándar. Los termogramas se corrigieron en el valor inicial y la concentración se normalizó antes de seguir analizándose usando un modelo diferente de dos estados en el software Origin v7.0.

45

El fragmento FAB VH6/VL9 variante humanizado mostró una única transición a 76,3 °C con una forma y amplitud consistentes con un desplegamiento cooperativo que se observa en general para fragmentos FAB plegados de forma compacta que indican que el proceso de ingeniería tuvo éxito al conservar la estabilidad de FAB. En general, la variante humanizada mostró una buena estabilidad térmica.

50

Tabla 6: Anticuerpos humanizados anti-OX40 humano

Variante de anticuerpo humanizado (IGHG1)	SEQ ID NOs	Mutaciones VH/VL	Expresión transitoria (mg/l)	Unión a OX40 humano
VH1/VL1	32, 39	N.A./N.A.	40	No
VH1/VL2	32, 40	N.A./L33M	21	No
VH1/VL3	32, 41	N.A./F71Y	17	No

ES 2 670 621 T3

Variante de anticuerpo humanizado (IGHG1)	SEQ ID NOs	Mutaciones VH/VL	Expresión transitoria (mg/l)	Unión a OX40 humano
VH2/VL1	33, 39	T23S/N.A.	13	No
VH2/VL2	33, 40	T23S/L33M	17	No
VH2/VL3	33, 41	T23S/F71Y	14	No
VH3/VL1	34, 39	R50H/N.A.	23	No
VH3/VL2	34, 40	R50H/L33M	22	No
VH3/VL3	34, 41	R50H/F71Y	18	No
VH4/VL4	35, 42	T23S-R50H/L33M-F71Y	15	Mala
VH4/VL9	35, 47	T23S-R50H/delección Y31-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	3	Débil
VH5/VL4	36, 42	T23S-R50H-S60N-S62A/L33M-F71Y	15	Mala
VH5/VL5	36, 43	T23S-R50H-S60N-S62A/ L33M-L46P-L47W-F71Y	2	Mala
VH5/VL6	36, 44	T23S-R50H-S60N-S62A/ E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	2	Mala
VH5/VL9	36, 47	T23S-R50H-S60N-S62A/delección Y31-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	6	Débil
VH6/VL5	37, 43	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ L33M-L46P-L47W-F71Y	0	N.D.
VH6/VL6	37, 44	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	0,5	N.D.
VH6/VL7	37, 45	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/delección Y31-L33M-F71Y	14	N.D.
VH6/VL8	37, 46	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/delección Y31-L33M-A34H-F71Y	7	N.D.
VH6/VL9	37, 47	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/delección Y31-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	3,5	Buena
VH6/VL10	37, 48	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/delección Y31-L33M -R54L-T56S-F71Y	0,5	N.D.
VH6/VL11	37, 49	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/delección Y31-L33M-A34H-R54L-T56S-F71Y	5,5	N.D.
VH7/VL5	38, 43	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ L33M-L46P-L47W-F71Y	1	N.D.
VH7/VL6	38, 44	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	1	N.D.
VH7/VL7	38, 45	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/delección Y31-L33M-F71Y	1,5	Débil
VH7/VL8	38, 46	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/delección Y31-L33M-A34H-F71Y	10	Débil
VH7/VL9	38, 47	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/delección Y31-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	3	Buena
VH7/VL11	38, 49	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/delección Y31-L33M-A34H-R54L-T56S-F71Y	11,5	Débil/Buena

Tabla 7: Comparación de marcos de 1D4 e IGHV 2-70*10 variables de cadena pesada de aceptor humano

Posición de Kabat	1D4	IGHV 2-70*10 injertado en CDR
10	G	A
11	I	L
12	L	V
13	Q	K
15	S	T

Posición de Kabat	1D4	IGHV 2-70*10 injertado en CDR
19	S	T
23	S	T
35b	G	S
41	S	P
44	G	A
48	L	I
50	H	R
60	N	S
62	A	S
65	S	T
66	G	R
79	F	V
81	K	T
82	I	M
82a	A	T
82b	S	N
82c	Y	M
84	T	P
85	T	V

Tabla 8: Comparación de marcos de 1D4 e IGKV 3-11*01 variables de cadena ligera de aceptor humano

Posición de Kabat	1D4	IGKV 3-11*01 injertado en CDR
1	Q	E
10	I	T
13	A	L
18	K	R
19	V	A
21	M	L
22	T	S
33	M	L
34	H	A
42	S	Q
43	S	A
45	K	R
46	P	L
47	W	L
54	L	R
56	S	T
58	V	I
70	S	D
71	Y	F
72	S	T
76	N	S
77	R	S
78	V	L
80	A	P
83	A	F
85	T	V

Tabla 9: Características de unión de anticuerpos anti-OX40 humanizados y quiméricos seleccionados.

Variantes humanizadas	SEQ ID NOs	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
Quimera 1D4	50, 51	$3,4 \times 10^4$	$3,08 \times 10^{-3}$	91
VH6/VL9	37, 47	$3,54 \times 10^4$	$3,56 \times 10^{-3}$	101
VH7/VL9	38, 47	$4,45 \times 10^4$	$3,12 \times 10^{-3}$	70

Ejemplo 7:**Caracterización de epítomos de anticuerpos anti-OX40 humanizados.**

- 5 Para caracterizar el epítomo de los anticuerpos anti-OX40 humanizados, se mapeó el anticuerpo VH6/VL9 con respecto a dominio definido de la región extracelular OX40 humana usando diversas proteínas quiméricas OX40 de rata-humano.

Preparación de proteínas quiméricas OX40 de humano-rata y ELISA

10

Las proteínas OX40 de rata y humano-rata se formatearon como proteínas de fusión Fc de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1. Para el ELISA, las proteínas OX40 se recubrieron a 2 µg/ml, en PBS, durante una noche a 4 °C en placas de 96 pocillos de unión elevada (Coastar). Las placas se bloquearon con PBS albúmina de suero bovino al 2% (BSA) antes de la incubación con el anticuerpo VH6/VL9 o el anticuerpo de control de isotipo. Las

15 placas se lavaron enconces y se incubaron con HRP específico de fragmento de F(ab')₂ de cabra antihumano (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Newmarket, Reino Unido). Después del lavado, las placas se incubaron con sustrato TMB (Bio-Rad Laboratories AG, Reinach, Suiza) para revelar la unión del anticuerpo. La reacción se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 2 M y se leyó la densidad óptica a 450 nM (DO 450 nM) en un espectrofotómetro Synergy HT2 (Biotek, Estados Unidos; distribuidor: WITTEC AG, Littau, Suiza).

20

Resultados

Independientemente de su origen, la región extracelular OX40 se ha dividido en cuatro módulos estructurales denominados dominio 1, 2, 3 y 4 (Compaan DM & Hymowitz SG (2006) Structure, 14(8): 1321-30). Se construyeron

25 proteínas OX40 quiméricas correspondientes a la región extracelular de OX40 humano (aminoácidos 29-214 de TNFRSF4 humano, numeración según la secuencia de Uniprot P43489) intercambiando uno o más de los cuatro dominios entre secuencias humanas y de rata. Por ejemplo, la proteína RHRR OX40 quimérica corresponde a la región extracelular OX40 de rata en la que el segundo dominio ha sido reemplazado por la secuencia de dominio humano correspondiente.

30

Se realizó un ELISA de unión para probar la reactividad del anticuerpo VH6/VL9 en la región extracelular OX40 humana (abreviada HHHH con SEQ ID NO: 11), región extracelular OX40 en rata (abreviada RRRR con SEQ ID NO: 52), y en cuatro proteínas quiméricas humanas-rata: RHRR (SEQ ID NO: 53), HRRR (SEQ ID NO: 54), HHRR (SEQ ID NO: 55), y RRHH (SEQ ID NO: 56). El resultado de este ELISA se muestra en la figura 7. Como un requisito

35 previo para este experimento de mapeo de epítomos, se demostró que el anticuerpo VH6/VL9 se unió a la proteína OX40 humana pero no a la proteína OX40 de rata, lo que indica que no había reactividad cruzada con OX40 de rata. Se encontró que el anticuerpo VH6/VL9 se unía a RHRR y HHRR, pero no a HRRR ni a RRHH, lo que indica que el epítomo VH6/VL9 se mapea en el segundo dominio de la región extracelular OX40 humana.

40 **Ejemplo 8:****El anticuerpo VH6/VL9 bloquea la reacción de linfocitos mixtos humanos destruyendo y bloqueando mecanismos**

- 45 La potencia del anticuerpo VH6/VL9 para suprimir las reacciones inmunes *in vitro* se ensayó en una reacción de linfocitos mixtos alogénica unidireccional (MLR). La MLR es un modelo *in vitro* de activación y proliferación de linfocitos T alorreactivos (O'Flaherty E et al., (2000) Immunology, 100(3): 289-99; DuPont B & Hansen JA (1976) Adv. Immunol. 23: 107-202). Cuando se mezclan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de dos donantes no emparentados, los linfocitos T se activan a través del reconocimiento de moléculas alogénicas de
- 50 histocompatibilidad mayor (MHC). Esta activación da como resultado la proliferación de linfocitos T. La reacción MLR se ha usado ampliamente para demostrar el efecto de los fármacos inmunosupresores dirigidos a los linfocitos T (Bromelow KV et al., (2001) J. Immunol. Methods, 247(1-2): 1-8). Los fármacos inmunosupresores, tal como la ciclosporina, funcionan principalmente inhibiendo la activación de los linfocitos T. Además de probar el efecto de bloqueo por el anticuerpo VH6/VL9, también se investigó la contribución de los mecanismos citotóxicos tales como la
- 55 citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en la inhibición de MLR. Se ensayaron tres formatos diferentes de anticuerpos del anticuerpo VH6/VL9 en este ensayo: un formato IGHG1 (denominado en el presente documento VH6/VL9), un formato IGHG1 no fucosilado (IgG1) (denominado en el presente documento VH6/VL9 no fucosilado) y un formato IGHG4 (IgG4) (denominado en el presente documento como VH6/VL9 IGHG4 S228P). Se sabe que los anticuerpos IGHG1 (IgG1) son competentes para el mecanismo de citotoxicidad tal como ADCC. Se

sabe que los anticuerpos IGHG1 no fucosilados presentan una actividad ADCC potenciada debido a una mayor afinidad por el FcγRIIIa expresado en células citotóxicas tales como células asesinas naturales (células NK) (Mizushima T et al., (2011) Genes Cells, 16(11): 1071-80). En contraste, se sabe que los anticuerpos IGHG4 (IgG4) no tienen tales mecanismos de citotoxicidad mediados por Fc tales como ADCC.

5

Formateo del anticuerpo VH6/VL9

El formateo de inmunoglobulina IGHG4 que tiene la sustitución S228P se logró reemplazando la secuencia de ADNc que codifica los dominios constantes CH1 de IGHG1, de región bisagra IGHG1, CH2 de IGHG1 y CH3 de IGHG1 para una secuencia de ADNc que codifica los dominios constantes CH1 de IGHG4, de región bisagra IGHG4 que tiene la sustitución S228P, CH2 de IGHG4 e y CH3 de IGHG4 en el vector específico de cadena pesada descrito en el Ejemplo 6. La sustitución S228P se introdujo en una plantilla de ADNc de cadena pesada de IGHG4 humana por técnicas de mutagénesis de PCR convencionales. La cadena pesada resultante tiene la SEQ ID NO: 57. La producción del anticuerpo VH6/VL9 IGHG1 no fucosilado siguió el protocolo descrito en el Ejemplo 14 de la publicación WO2010/095031.

10

15

Reacción de linfocitos mixtos

Se recogió sangre de dos donantes humanos diferentes en tres S-Monovette de 10 ml con citrato como anticoagulante (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMc) de los dos donantes humanos se purificaron usando tubos de filtro de separación de sangre de 50 ml (distribuidor: Brunswick, Basilea, Suiza) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron dos veces con medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, PAA Laboratories, Pasching, Austria) sin FBS. Las células estimuladoras de los dos donantes se prepararon por incubación con 50 µg/ml de mitomicina C (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) durante 30 minutos a 37 °C. Las células se lavaron entonces tres veces con RPMI sin FBS y se suspendieron de nuevo a 1×10^6 células/ml en RPMI, FBS al 10 % (PAA Laboratories, Pasching, Austria), L-glutamina 2 mM (Lonza, Lovaina, Bélgica), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Biochrom AG, Berlín, Alemania). Las células respondedoras se resuspendieron en RPMI, FBS al 10%, L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina en microplacas de 96 pocillos en U (TPP, Trasadingen, Suiza). 50.000 células estimuladoras y 80.000 células respondedoras se distribuyeron en un volumen final de 100 µl a cada pocillo. Se añadieron 100 µl de diluciones de anticuerpos (o solo medio) a los pocillos. Las placas se incubaron durante 7 días a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5%. Las células se pulsaron con 0,5 µCi de ³H timidina (Perkin Elmer, Basilea Suiza) durante las últimas 18 horas. Las células se recogieron en un filtro de rejilla (Perkin Elmer) y la radioactividad incorporada se cuantificó en un contador beta de Wallac (Perkin Elmer).

20

25

30

35

Resultados

Los resultados mostrados en la figura 8 demuestran que el anticuerpo VH6/VL9 es capaz de inhibir eficazmente la MLR para dos individuos diferentes (respondedores) con valores de CE⁵⁰ de aproximadamente 100 ng/ml. Los resultados también muestran una respuesta diferente según el formato de anticuerpo usado y se observa una diferencia en la contribución de los mecanismos de bloqueo y citotóxicos en la MLR de diferentes individuos.

40

La reactividad de los linfocitos T del respondedor 1 (figura 8A) se inhibió de manera eficaz por los formatos IGHG1 e IGHG4, lo que indica que los mecanismos citotóxicos no son críticos para el respondedor 1. Por el contrario, el formato IGHG4 solo fue poco capaz de bloquear la MLR del respondedor 2 (figura 8B) a alta concentración y perdió muy rápidamente su efecto a concentraciones más bajas, mientras que el formato IGHG1 podía alcanzar más del 60% de inhibición, lo que implicaba que, para el respondedor 2, los mecanismos de destrucción son responsables de la mayoría de los efectos inhibidores.

45

Esta diferencia en el modo de acción probablemente surge del hecho de que la activación, la proliferación y la supervivencia de los linfocitos T en una reacción MLR depende de manera variable de las señales coestimuladoras de OX40 entre individuos, dependiendo del grado de reactividad alérgica y posiblemente otras señales coestimuladoras. Para individuos poco dependientes de las señales coestimulantes derivadas de OX40, la eliminación de los linfocitos T activados por el mecanismo ADCC es el principal mecanismo de acción del VH6/VL9.

50

55

Sorprendentemente, el formato IGHG1 no fucosilado mostró una capacidad muy potente para inhibir la MLR para ambos respondedores. Esta observación resalta el hecho de que incluso si un mecanismo de bloqueo puede ser suficiente para lograr la inhibición de MLR, la adición o mejora de los mecanismos de destrucción mejora el efecto inhibidor de los anticuerpos anti-OX40. Dicha mejora es particularmente útil cuando se tratan trastornos mediados

por OX40 independientemente del estado coestimulador de OX40 de los pacientes, por ejemplo, cuando los pacientes tienen bajos niveles de expresión de OX40.

Ejemplo 9:

5

El anticuerpo VH6/VL9 bloquea la enfermedad xenogénica de injerto contra huésped

La reacción xenogénica de injerto contra huésped (GVH) es un modelo para la enfermedad alogénica de injerto contra huésped (GVHD) observada después del trasplante de médula ósea en pacientes humanos. La reacción de GVH es una respuesta inmune aguda mediada por células inmunes injertadas que atacan el entorno del huésped como consecuencia de un reconocimiento alogénico o xenogénico de MHC (Murphy WJ et al., (1996) Semin. Immunol. 8(4): 233-41). Los linfocitos T son las principales células efectoras de las reacciones de GVH. La potencia inmunosupresora del anticuerpo VH6/VL9 se probó en un modelo xenogénico de GVHD basado en la reconstitución de ratones SCID con PBMC humanas. En este modelo, las PBMC humanas y principalmente los linfocitos T, lanzan una fuerte respuesta contra las células huésped de ratón. La reacción conduce notablemente a la inflamación cutánea e intestinal grave acompañada de pérdida de peso. La lectura más relevante de este modelo es la supervivencia de los animales.

Método

20

Los animales (ratones SCID) se irradiaron de forma sub-letal antes de reconstituirse con 30 millones de PBMC humanas por vía intraperitoneal. Los ratones también se agotaron para las células NK de ratón mediante inyecciones dos veces a la semana con el anticuerpo Tmbeta1. El tratamiento con anticuerpo VH6/VL9, Enbrel® o vehículo se administró i.v. semanalmente durante cinco dosis consecutivas y comenzó dos días antes de la inyección de PBMC. Los animales se trataron con vehículo (PBS) o el anticuerpo VH6/VL9 a 10 mg/kg o 1 mg/kg, o Enbrel® (una proteína de fusión del receptor 2 soluble de TNF humano fusionado al componente Fc de IgG1 humana, Amgen-Pfizer) a 8 mg/kg. Los animales se revisaron y se puntuaron tres veces por semana para los síntomas de GVHD incluyendo pérdida de peso, diarrea, aspecto del pelaje y comportamiento general. Los animales se sacrificaron éticamente si los síntomas se consideraban demasiado graves.

30

Resultados

La figura 9 muestra que el anticuerpo VH6/VL9 suprimió muy potentemente la reacción de GVHD incluso a la dosis más baja de 1 mg/kg. Sorprendentemente, el anticuerpo VH6/VL9 demostró una eficacia mejorada frente a Enbrel®, que es una terapia reconocida para GVHD en seres humanos (Xhaard A et al., (2011) Bull. Cancer, 98(8): 889-99; Simpson D (2001) Expert Opin. Pharmacother. 2(7): 1109-17). El tiempo medio de supervivencia de los animales tratados con el anticuerpo VH6/VL9 a 1 o 10 mg/kg fue cuatro veces más largo en comparación con el grupo tratado con vehículo (Tabla 10) y dos veces más largo en comparación con Enbrel®. Además, este resultado pone de relieve que el anticuerpo VH6/VL9 no posee actividad agonista, ya que se ha informado que un anticuerpo anti-OX40 agonista empeora la GVHD en modelos alogénicos de GVHD de ratón (Valzasina B et al., (2005) Blood, 105(7): 2845-51; Blazar BR et al., (2003) Blood, 101(9): 3741-8), un evento que no se observó en el presente estudio.

Tabla 10: Tiempo medio de supervivencia (en días) de los grupos de tratamiento indicados

Tratamiento	Vehículo	Enbrel®	1D4 (1 mg/kg)	1D4 (10 mg/kg)
Supervivencia media (días)	11,5	20,5	42	47,5

Vehículo: solo PBS. 1D4: Anticuerpo GBR 830-1D4; Enbrel® fue el producto clínico.

45 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Glenmark Pharmaceutical SA

<120> Anticuerpos que se unen a OX40 y sus usos

50

<130> 17741/US

<150> US 61/506.491

<151> 11-07-2011

55

<160> 89

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <223> CDR 1 de cadena pesada de 1D4

<400> 1
 Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly
 1 5 10

15 <210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <223> CDR 2 de cadena pesada de 1D4

<400> 2
 Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys
 1 5

25 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <220>
 <223> CDR 3 de cadena pesada de 1D4

<400> 3
 Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr
 1 5 10

35 <210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

40 <220>
 <223> CDR 1 de cadena ligera de 1D4

45 <400> 4
 Ser Ser Val Ser Tyr
 1 5

50 <210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

55 <220>
 <223> CDR 2 de cadena ligera de 1D4

ES 2 670 621 T3

<400> 5
 Ala Thr Ser
 1

5 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <223> CDR 3 de cadena ligera de 1D4

<400> 6
 Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
 1 5

15 <210> 7
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <223> secuencia de región variable de cadena pesada de 1D4

<400> 7
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln 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 Thr Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Gly Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

30 <210> 8
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

ES 2 670 621 T3

<220>

<223> secuencia de región variable de cadena ligera de 1D4

<400> 8

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

5

<210> 9

<211> 354

<212> ADN

10

<213> Mus musculus

<220>

<223> Secuencia de ADN de secuencia de región variable de cadena pesada de 1D4

<400> 9

caggtgacgc tgaaggagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60

acttgttctt tctctggggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 120

cagccttcag ggaagggctc ggagtggtcg gcacacattt ggtgggatga tgataagtac 180

tataacacag ccctgaagag cgggctcaca atctccaagg atacctcaa aaaccaggtc 240

ttcctcaaga tcgccagtgt ggacactaca gatactgcca catactactg tgctcgaata 300

gactgggacg ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc ctca 354

20

<210> 10

<211> 318

<212> ADN

<213> Mus musculus

25

<220>

<223> Secuencia de ADN de secuencia de región variable de cadena ligera de 1D4

<400> 10

ES 2 670 621 T3

cagattgtac tgactcagtc tccagcaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca 60
 atgacttgca gggccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagccagga 120
 tcctccccc aaccctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctgc 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcaacagagt ggaggctgaa 240
 gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc cgtggacgtt cggaggagga 300
 accaagctgg agataaaa 318

<210> 11
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> dominio extracelular de OX40 humano (aminoácidos 29-214 de P43489)

<400> 11
 Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His
 1 5 10 15
 Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln
 20 25 30
 Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val
 35 40 45
 Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly
 50 55 60
 Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg
 65 70 75 80
 Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp
 85 90 95
 Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala
 100 105 110

ES 2 670 621 T3

Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln
 115 120 125

Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro
 130 135 140

Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr
 145 150 155 160

Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr
 165 170 175

Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala
 180 185

<210> 12
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> receptor OX40 humano (P43489)

<400> 12
 Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
 20 25 30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
 35 40 45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
 50 55 60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
 65 70 75 80

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
 85 90 95

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
 100 105 110

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
 115 120 125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
 130 135 140

5

10

ES 2 670 621 T3

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
 165 170 175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
 180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
 195 200 205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
 210 215 220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
 225 230 235 240

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
 245 250 255

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
 260 265 270

Thr Leu Ala Lys Ile
 275

<210> 13
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<220>
 <223> CDR 1 de cadena pesada extendida de 1D4

10

<400> 13
 Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp
 1 5 10

15

<210> 14
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20

<220>
 <223> CDR 2 de cadena pesada extendida de 1D4

<400> 14
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
 1 5 10 15

25

Leu Lys Ser

<210> 15

ES 2 670 621 T3

<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

5 <220>
<223> CDR 3 de cadena pesada extendida de 1D4

<400> 15
Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

10 <210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

15 <220>
<223> CDR 1 de cadena ligera extendida de 1D4

<400> 16
Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr
1 5 10

20 <210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

25 <220>
<223> CDR 2 de cadena ligera extendida de 1D4

30 <400> 17
Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5 10

35 <210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

40 <220>
<223> CDR 3 de cadena ligera extendida de 1D4

<400> 18
Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
1 5

45 <210> 19
<211> 115
<212> PRT
<213> Homo sapiens

50 <220>
<223> IGHV2-70*10 humano

<400> 19

ES 2 670 621 T3

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

Trp Ile Ala Arg 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 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 20
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> IGHV2-70*01 humano

<400> 20
 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

5

10

ES 2 670 621 T3

Gln Val 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 Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Gly 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

Cys Ala His Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 23
<211> 115
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
10 <223> IGHV2-70*11 humano

<400> 23
Arg 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 Arg 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

ES 2 670 621 T3

85 90 95

Cys Ala Arg Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 107
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
10 <223> IGKV3-11*01 humano

<400> 24
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 Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 25
15 <211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
20 <223> IGKV1-39*01 humano

<400> 25
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

ES 2 670 621 T3

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 Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 26
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> IGKV1D-39*01 humano

<400> 26
 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 Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 27
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> IGKV3-11*02

ES 2 670 621 T3

<400> 27

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 Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 28

5 <211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10 <223> IGKV3-20*01 humano

<400> 28

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

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

15

ES 2 670 621 T3

<210> 29
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Dominio variable de cadena pesada VH1

<400> 29
 Gln Val Thr Leu Lys 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 Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Ala Arg Ile Trp 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 Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10

<210> 30
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Dominio variable de cadena ligera VL1

<400> 30
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

20

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
 20 25 30

ES 2 670 621 T3

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

Tyr Ala Thr 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 Trp Ser Ser Asn Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 31
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADNc de scFv VH1-VL1

<400> 31
 caggtcacac tgaagagtc tggacccgcc ctggtcaagc ccaccagac actgaccctg 60
 acctgcacct tcagcggcct cagcctgagc acaagcggca tggcgtgtc ctggatcaga 120
 cagcctcctg gcaaggcctt ggaatgatc gcccgattt ggtgggacga cgacaagtac 180
 tacagcacca gcctgaaaac cgggctgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccaggtg 240
 gtgctgacca tgaccaacat ggaccccgctg gacaccgcc cctactactg cgccagaatc 300
 gactgggacg gcttgcctta ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtgtc tagcggaggc 360
 ggaggatctg gcggcggag aagtggcggg ggggatctg agatcgtgct gacacagagc 420
 cccgccacc tgtctctgag ccctggcgaa agagccacc tgagctgtag agccagcagc 480
 agcgtgtcct actacctggc ctggtatcag cagaagccc gccaggctcc cgggctgctg 540
 atctacgcc caagcaatcg ggccacagc atccctgcc gattttctgg cagcggctcc 600
 ggcaccgact tcaccctgac catctccagc ctggaaccgc aggacttcgc cgtgtactac 660
 tgccagcagt ggtccagcaa cccctggaca tttggccagg gcaccaaggt ggaaatcaag 720

<210> 32
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> IGHG1 de cadena pesada VH1

<400> 32

ES 2 670 621 T3

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

Trp Ile Ala Arg Ile Trp 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 Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

ES 2 670 621 T3

			260						265						270			
	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala		
			275					280						285				
	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val		
			290				295					300						
	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr		
	305					310					315					320		
	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr		
					325					330					335			
	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu		
			340						345					350				
	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys		
			355					360					365					
	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser		
			370				375					380						
	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp		
	385					390					395					400		
	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser		
					405					410					415			
	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala		
				420					425					430				
	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
			435					440					445					
5	<210>	33																
	<211>	448																
	<212>	PRT																
	<213>	Artificial																
	<220>																	
10	<223>	IGHG1 de cadena pesada VH2																
	<400>	33																
	Gln	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Gln		
	1				5					10					15			
	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser		
				20					25					30				

ES 2 670 621 T3

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Ala Arg Ile Trp 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 Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

ES 2 670 621 T3

290

295

300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> IGHG1 de cadena pesada VH3

10

<400> 34
Gln Val Thr Leu Lys 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 Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

ES 2 670 621 T3

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

ES 2 670 621 T3

325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

<210> 35
<211> 448
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> IGHG1 de cadena pesada VH4

<400> 35
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

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

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

Trp Ile Ala His Ile Trp 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

ES 2 670 621 T3

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

ES 2 670 621 T3

355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 36
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> IGHG1 de cadena pesada VH5

10

<400> 36
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

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

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
 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 Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

ES 2 670 621 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

ES 2 670 621 T3

```
385           390           395           400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
           405           410
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
           420           425           430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
           435           440           445
<210> 37
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial
5
<220>
<223> IGHG1 de cadena pesada VH6
10
<400> 37
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1           5           10           15
Thr Leu Thr 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 Pro Gly Lys Ala Leu Glu
          35           40           45
Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
 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 Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
          115          120          125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130          135          140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145          150          155          160
```

ES 2 670 621 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

ES 2 670 621 T3

420 425 430

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

<210> 38
 <211> 448
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> IGHG1 de cadena pesada VH7

<400> 38
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Thr 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 Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
 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 Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

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

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

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

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

ES 2 670 621 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 39
 <211> 214
 <212> PRT

ES 2 670 621 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera VL1

5

<400> 39

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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

Tyr Ala Thr 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 Trp Ser Ser Asn Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln 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> 40

<211> 214

<212> PRT

10

ES 2 670 621 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera VL2

5

<400> 40

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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Thr 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 Trp Ser Ser Asn Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln 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> 41

<211> 214

<212> PRT

10

ES 2 670 621 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera VL3

5

<400> 41

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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln 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> 42

<211> 214

<212> PRT

10

ES 2 670 621 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera VL4

5

<400> 42

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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln 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

10

<210> 43

ES 2 670 621 T3

<211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cadena ligera VL5

<400> 43

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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
 20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile
 35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln 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> 44

10

ES 2 670 621 T3

<211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cadena ligera VL6

<400> 44

Gln 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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
 20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile
 35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln 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> 45

10

ES 2 670 621 T3

<211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cadena ligera VL7

<400> 45

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 Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 46

10

ES 2 670 621 T3

<211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cadena ligera VL8

<400> 46

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 Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

10

ES 2 670 621 T3

<210> 47
 <211> 213
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cadena ligera VL9

 10 <400> 47
 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 Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

 Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

ES 2 670 621 T3

<210> 48
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cadena ligera VL10

<400> 48
 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 Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 49

10

ES 2 670 621 T3

<211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cadena ligera VL11

<400> 49
 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 Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 50
 <211> 448

10

ES 2 670 621 T3

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> cadena pesada de quimera 1D4

<400> 50
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln 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 Thr Ala
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

ES 2 670 621 T3

180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 51
<211> 213
<212> PRT

ES 2 670 621 T3

<213> Artificial

<220>

<223> cadena ligera de quimera 1D4

5

<400> 51

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys

210

10

ES 2 670 621 T3

<210> 52
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

5

<220>
 <223> dominio extracelular de OX40 de rata

<400> 52
 Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His
 1 5 10 15
 Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys
 20 25 30
 Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His Pro Cys Glu Pro Gly Phe Tyr
 35 40 45
 Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys Thr Gln Cys Asn
 50 55 60
 His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr Pro Thr Glu Asp
 65 70 75 80
 Thr Val Cys Gln Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln Asp Ser Ser
 85 90 95
 His Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser
 100 105 110
 Pro Gly Ser Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ser
 115 120 125
 Gly Lys Gln Ile Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp Thr Val Cys
 130 135 140
 Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr Gln Arg Thr
 145 150 155 160
 Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp Pro Arg Thr
 165 170 175
 Ser Gln Leu Pro Ser Thr Pro Thr Leu Val Ala Pro Glu Gly Pro
 180 185 190

10

<210> 53
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> dominio extracelular de OX40 humano-rata quimera RHRR

ES 2 670 621 T3

<400> 53

Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His
1 5 10 15

Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys
20 25 30

Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr
35 40 45

Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn
50 55 60

Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp
65 70 75 80

Thr Val Cys Gln Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln Asp Ser Ser
85 90 95

His Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser
100 105 110

Pro Gly Ser Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ser
115 120 125

Gly Lys Gln Ile Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp Thr Val Cys
130 135 140

Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr Gln Arg Thr
145 150 155 160

Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp Pro Arg Thr
165 170 175

Ser Gln Leu Pro Ser Thr Pro Thr Leu Val Ala Pro Glu Gly Pro
180 185 190

5

<210> 54
<211> 190
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> dominio extracelular de OX40 humano-rata quimera RHHH

<400> 54

Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His

15

ES 2 670 621 T3

1 5 10 15

Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys
20 25 30

Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr
35 40 45

Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn
50 55 60

Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp
65 70 75 80

Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys
85 90 95

Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly
100 105 110

Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys
115 120 125

His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp
130 135 140

Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala
145 150 155 160

Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln
165 170 175

Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala
180 185 190

<210> 55
<211> 187
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> dominio extracelular de OX40 humano-rata quimera HHRR

<400> 55
Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His
1 5 10 15

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln
20 25 30

ES 2 670 621 T3

Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val
35 40 45

Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly
50 55 60

Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Gln
65 70 75 80

Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln Asp Ser Ser His Lys Leu Gly
85 90 95

Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Ser Asn
100 105 110

Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ser Gly Lys Gln Ile
115 120 125

Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp Thr Val Cys Glu Asp Arg Ser
130 135 140

Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr Gln Arg Thr Thr Phe Arg Pro
145 150 155 160

Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp Pro Arg Thr Ser Gln Leu Pro
165 170 175

Ser Thr Pro Thr Leu Val Ala Pro Glu Gly Pro
180 185

<210> 56
<211> 189
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> dominio extracelular de OX40 humano-rata quimera RRHH

10

<400> 56
Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His
1 5 10 15

Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys
20 25 30

Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His Pro Cys Glu Pro Gly Phe Tyr
35 40 45

Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys Thr Gln Cys Asn
50 55 60

ES 2 670 621 T3

His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr Pro Thr Glu Asp
65 70 75 80

Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys
85 90 95

Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly
100 105 110

Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys
115 120 125

His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp
130 135 140

Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala
145 150 155 160

Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln
165 170 175

Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg
180 185

<210> 57
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> IGHG4 de cadena pesada VH6 S228P

10

<400> 57
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr 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 Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
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

ES 2 670 621 T3

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

ES 2 670 621 T3

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 58
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> dominio variable de cadena pesada VH6

<400> 58
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Thr 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 Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
 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 Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 59

ES 2 670 621 T3

<211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> dominio variable de cadena pesada VH7

<400> 59
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr 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 Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
 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 Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10

<210> 60
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Dominio variable de cadena ligera VL9

<400> 60
 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 Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

20

ES 2 670 621 T3

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

5 <210> 61
<211> 354
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia codificante de ADN de dominio variable de cadena pesada VH6

<400> 61
caggtcacac tgaagagtc tggacccgcc ctggtcaagc ccaccagac actgaccctg 60
acctgcagct tcagcggcct cagcctgagc acaagcggca tggcgtggg ctggatcaga 120
cagcctcctg gcaagccct ggaatggatc gcccatattt ggtgggatga tgataaatat 180
tataacaccg ccctgaaaac ccgcctgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccaggtg 240
gtgctgacca tgaccaacat ggacccctg gacaccgcca cctactactg cgccagaatc 300
gactgggacg gcttcgccta ttggggccag ggaaccctgg tgaccgtgag cagc 354

15 <210> 62
<211> 354
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Secuencia codificante de ADN de dominio variable de cadena pesada VH7

<400> 62
caggtcacac tgaagagtc tggacccgcc ctggtcaagc ccaccagac actgaccctg 60
acctgcagct tcagcggcct cagcctgagc acaagcggca tggcgtggg ctggatcaga 120
cagcctcctg gcaagccct ggaatggctc gccacattt ggtgggatga tgataaatat 180
tataacaccg ccctgaaaac ccgcctgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccaggtg 240
gtgctgacca tgaccaacat ggacccctg gacaccgcca cctactactg cgccagaatc 300
gactgggacg gcttcgccta ttggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc 354

25 <210> 63
<211> 318
<212> ADN
<213> Artificial

ES 2 670 621 T3

<220>
 <223> Secuencia codificante de ADN de dominio variable de cadena ligera VH9

<400> 63
 gagatcgtgc tgacacagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga aagagccacc 60
 ctgagctgta gagccagcag cagcgtgtcc tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc 120
 caggcgcgcg gccctgggat ttatgcgacc agcaatcggg ccacagggat ccctgccaga 180
 ttttctggca gcggctccgg caccgactac accctgacca tctccagcct ggaacccgag 240
 gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg tccagcaacc cctggacatt tggccagggc 300
 5 accaaagtgg aaattaaa 318

<210> 64
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Mus musculus

<220>
 <223> CDR 1 de cadena pesada de VH6

15 <400> 64
 Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly
 1 5 10

<210> 65
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> CDR 2 de cadena pesada de VH6

25 <400> 65
 Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <220>
 <223> CDR 3 de cadena pesada de VH6

35 <400> 66
 Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr
 1 5 10

40 <210> 67
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

45 <220>
 <223> CDR 1 de cadena ligera de VL9

ES 2 670 621 T3

<400> 67
 Ser Ser Val Ser Tyr
 1 5

5 <210> 68
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <223> CDR 2 de cadena ligera de VL9

<400> 68
 Ala Thr Ser
 1

15 <210> 69
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <223> CDR 3 de cadena ligera de VL9

<400> 69
 Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
 1 5

25 <210> 70
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <220>
 <223> CDR 1 de cadena pesada extendida de VH6

<400> 70
 Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp
 1 5 10

35 <210> 71
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> CDR 2 de cadena pesada extendida de VH6

45 <400> 71
 Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
 1 5 10 15

Leu Lys Thr

50 <210> 72
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

55 <220>

ES 2 670 621 T3

<223> CDR 3 de cadena pesada extendida de VH6

<400> 72

Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

5

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

<220>

<223> CDR 1 de cadena ligera extendida de VL9

<400> 73

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr
1 5 10

15

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> CDR 2 de cadena ligera extendida de VL9

25

<400> 74

Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr
1 5 10

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

30

<220>

<223> CDR 3 de cadena ligera extendida de VL9

35

<400> 75

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
1 5

<210> 76

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

<220>

<223> módulo 2 de dominio extracelular de OX40 humano

45

<400> 76

ES 2 670 621 T3

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
1 5 10 15

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
20 25 30

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg
35 40

<210> 77
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> dominio variable de cadena pesada VH2

10

<400> 77
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

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

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

Trp Ile Ala Arg Ile Trp 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 Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 78
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> dominio variable de cadena pesada VH3

20

<400> 78

ES 2 670 621 T3

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

Trp Ile Ala His Ile Trp 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 Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 79
<211> 118
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> dominio variable de cadena pesada VH4

<400> 79
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

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

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

Trp Ile Ala His Ile Trp 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

ES 2 670 621 T3

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 80
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> dominio variable de cadena pesada VH5

10

<400> 80
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

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

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
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 Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 81
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> Dominio variable de cadena ligera VL2

20

<400> 81

ES 2 670 621 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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
 20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Thr 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 Trp Ser Ser Asn Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 82
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

10

<220>
 <223> Dominio variable de cadena ligera VL3

<400> 82
 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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
 20 25 30

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

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

ES 2 670 621 T3

<210> 83
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Dominio variable de cadena ligera VL4

<400> 83
 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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
 20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

10

<210> 84
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Dominio variable de cadena ligera VL5

<400> 84
 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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
 20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile
 35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

20

ES 2 670 621 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 85
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Dominio variable de cadena ligera VL6

10

<400> 85
Gln 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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile
35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 86
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> Dominio variable de cadena ligera VL7

20

<400> 86
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 Ser Ser Val Ser Tyr Met

ES 2 670 621 T3

20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 87
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Dominio variable de cadena ligera VL8

<400> 87
 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 Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 88
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 670 621 T3

<220>

<223> Dominio variable de cadena ligera VL10

<400> 88

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 Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
85 90 95

5 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 89

<211> 106

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Dominio variable de cadena ligera VL11

15 <400> 89

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 Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr

ES 2 670 621 T3

85

90

95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 humano que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.
2. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.
3. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, 58, 59, 79 y 80; o comprende una región no CDR de una secuencia de la región variable de cadena pesada que es al menos un 80% idéntica a la región no CDR de la secuencia de la región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, 58, 59, 79 o 80.
4. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 35, 36, 37 y 38; o comprende una región no CDR de una secuencia de la región variable de cadena pesada que es al menos un 80% idéntica a la región no CDR de la secuencia de la región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 35, 36, 37 o 38.
5. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región marco variable de cadena pesada que es el producto o derivado de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en IGHV2-70*10 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, IGHV2-70*01 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, IGHV2-70*13 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, IGHV2-5*09 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, e IGHV2-70*11 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.
6. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región marco variable de cadena pesada que es el producto o derivado de un gen humano IGHV2-70*10 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, y en el que la región marco variable de cadena pesada comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco variable de cadena pesada correspondiente del anticuerpo murino correspondiente.
7. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, y en el que la región marco variable de cadena pesada comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco variable de cadena pesada correspondiente del anticuerpo murino correspondiente.
8. El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de la reivindicación 6 o 7, en el que la modificación de aminoácidos comprende una sustitución de aminoácidos en la posición aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en 23, 35b, 48, 50, 60 y 62, en el que la posición aminoacídica de cada miembro del grupo se indica de acuerdo con la numeración de Kabat.
9. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, 60, 86, 87 y 89; o una región no CDR de una secuencia de la región variable de cadena ligera que es al menos un 80% idéntica a la región no CDR de la secuencia de la región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 8, 60, 86, 87 y 89.
10. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 45, 46, 47 and 49; or una región no CDR que es al menos un 80% idéntica a la

región no CDR de la secuencia de región variable de cadena ligera de la secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 45, 46, 47 o 49.

11. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región marco variable de cadena ligera que es el producto o derivado de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en IGKV3-11*01 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, IGKV1-39*01 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, IGKV1D-39*01 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, IGKV3-11*02 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 e IGKV3-20*01 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.

12. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región marco variable de cadena ligera que es el producto o derivado del gen humano IGHV3-11*01 (SEQ ID NO: 24), y en el que la región marco variable de cadena ligera comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco correspondiente de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino correspondiente.

13. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39, y en el que la región marco variable de cadena ligera comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco variable de cadena ligera correspondiente del anticuerpo murino correspondiente.

14. El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de la reivindicación 12 o 13, en el que la modificación de aminoácidos comprende una sustitución de aminoácidos en la posición aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en 1, 33, 34, 46, 47, 54, 56, y 71, en el que la posición aminoacídica de cada miembro del grupo se indica de acuerdo con la numeración de Kabat.

15. El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de la reivindicación 12 o 13, en el que la modificación aminoacídica comprende una delección de aminoácido en la posición aminoacídica 31, en el que la posición aminoacídica se indica de acuerdo con la numeración de Kabat.

16. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende: (a) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38; y (b) una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47.

17. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende: (a) una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 59; y

(b) una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.

18. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1 a 17, que comprende además regiones constantes pesadas y/o ligeras en el que la región constante pesada humana se selecciona del grupo de inmunoglobulinas humanas que consiste en IGHG1, IGHG1 no fucosilada e IGHG4.

19. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo: un anticuerpo monovalente, un anticuerpo de longitud completa, un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, F(ab')₂, scFv, dímeros de Fv monocatenarios biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos y scFv genéticamente condensado al mismo anticuerpo o uno diferente.

20. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que el anticuerpo comprende una región Fc variante que comprende al menos una modificación aminoacídica con respecto a la región Fc del anticuerpo parental, mientras que el anticuerpo que comprende la región Fc variante presenta una función efectora alterada en comparación con el anticuerpo parental.

21. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se une a OX40 humano con una afinidad de 110 nM o menos.

22. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21.
- 5 23. Un vector que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 22.
24. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 22 o el vector de la reivindicación 23.
- 10 25. Un método para producir un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a OX40 humano que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 24, de manera que el ácido nucleico se exprese y se produzca el anticuerpo.
26. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las
15 reivindicaciones 1 a 21 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
27. Un inmunocombinado que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 unido a un agente terapéutico.
- 20 28. La composición de la reivindicación 26 que comprende adicionalmente otro agente farmacéuticamente activo.
29. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 para su uso como un medicamento.
- 25 30. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 para uso en un método para tratar artritis reumatoide, uveítis autoinmune, esclerosis múltiple, lupus (tal como lupus eritematoso sistémico) y enfermedad de injerto contra huésped (GVHD).
- 30 31. Un kit que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, la composición de la reivindicación 26 o 28, o el inmunocombinado de la reivindicación 27 para el tratamiento de un trastorno mediado por OX40.

FIG. 1A

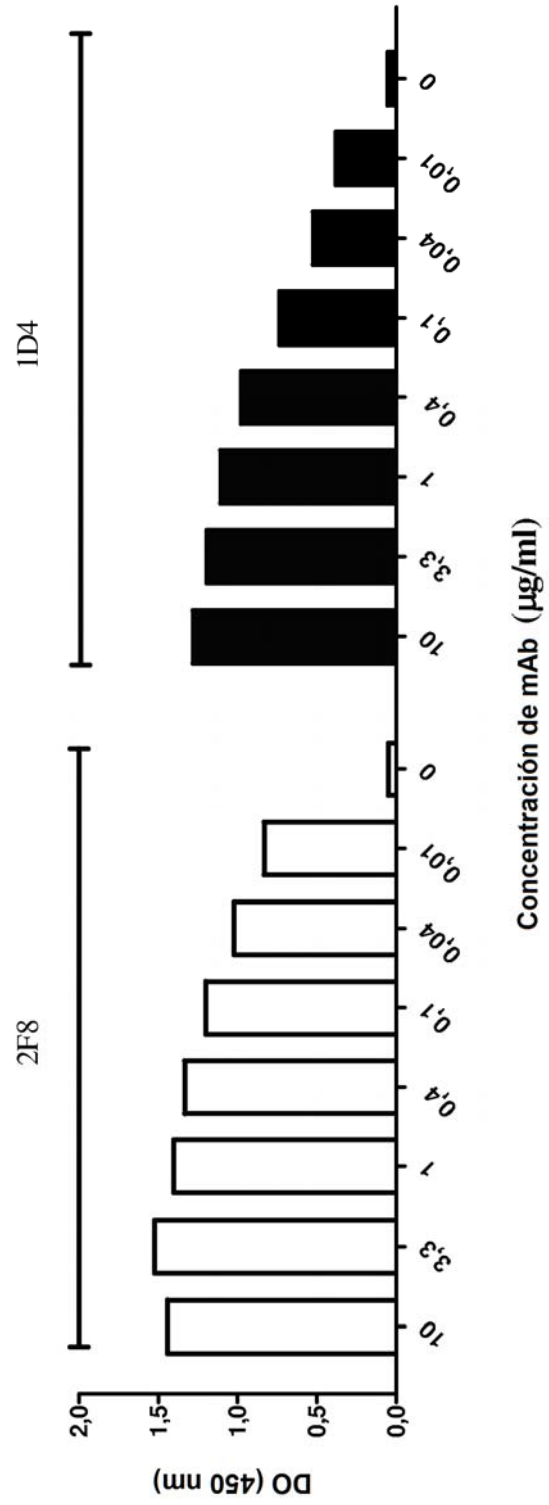


FIG. 1B

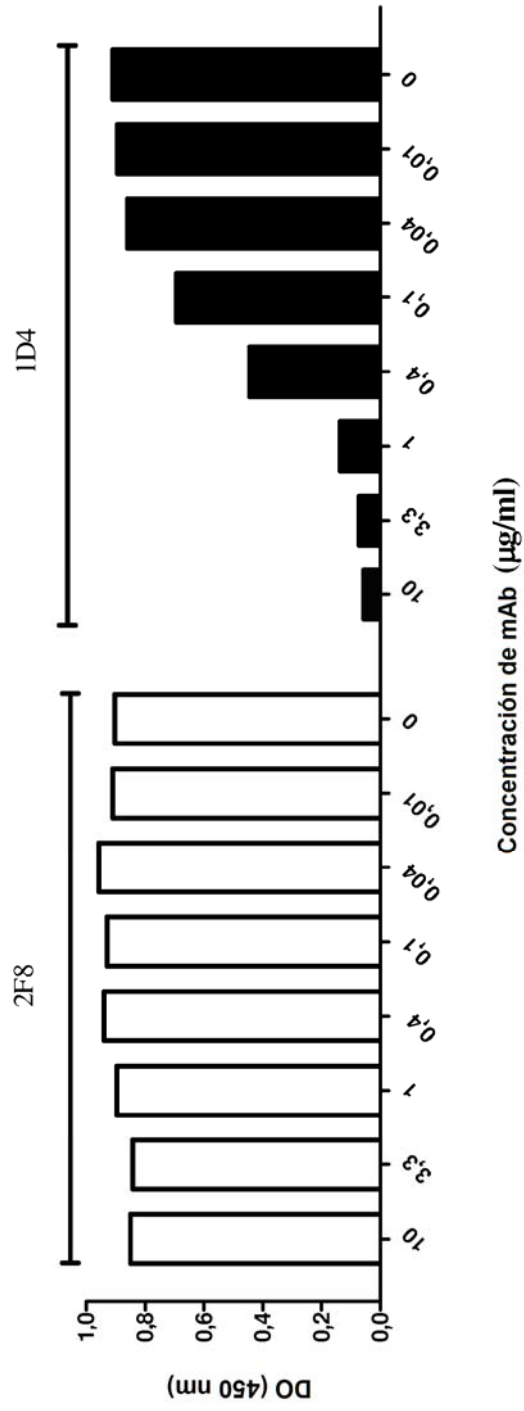


FIG. 2

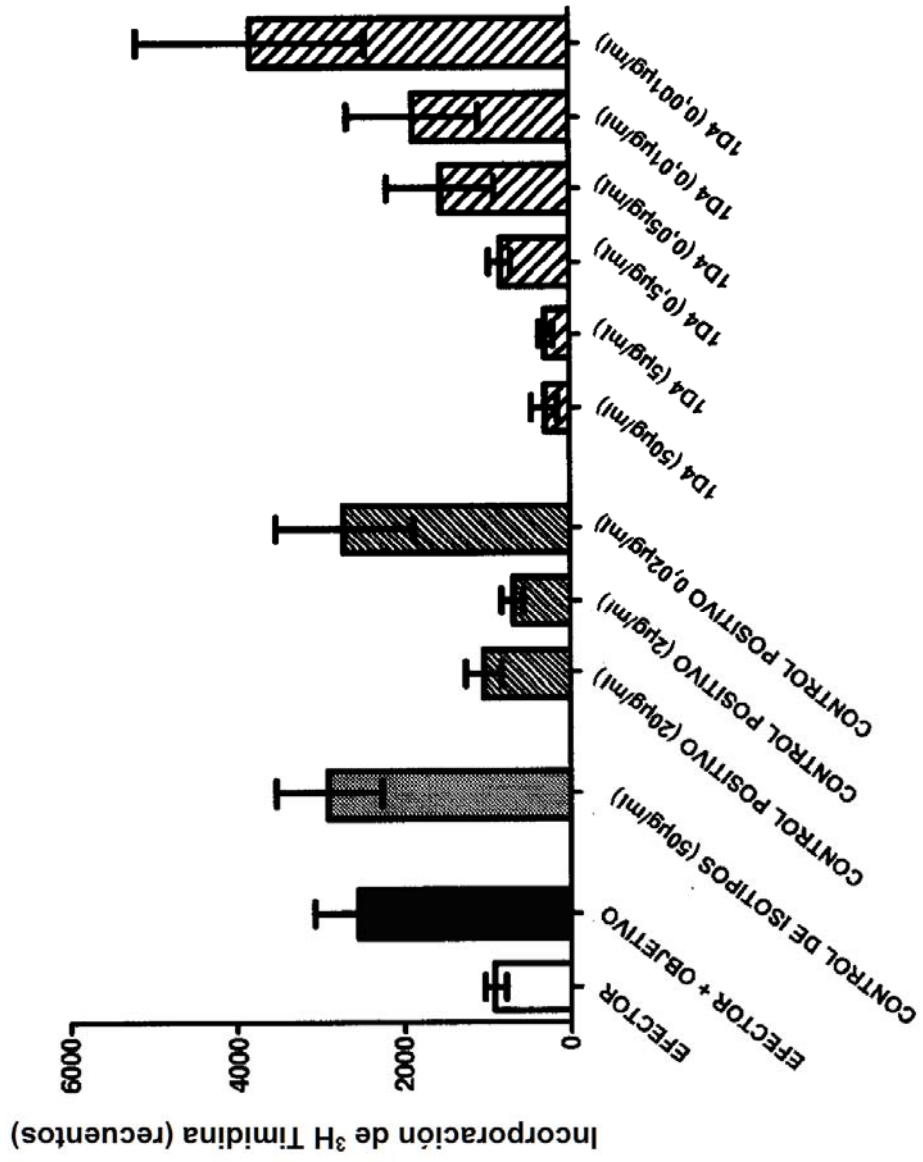


FIG. 3A

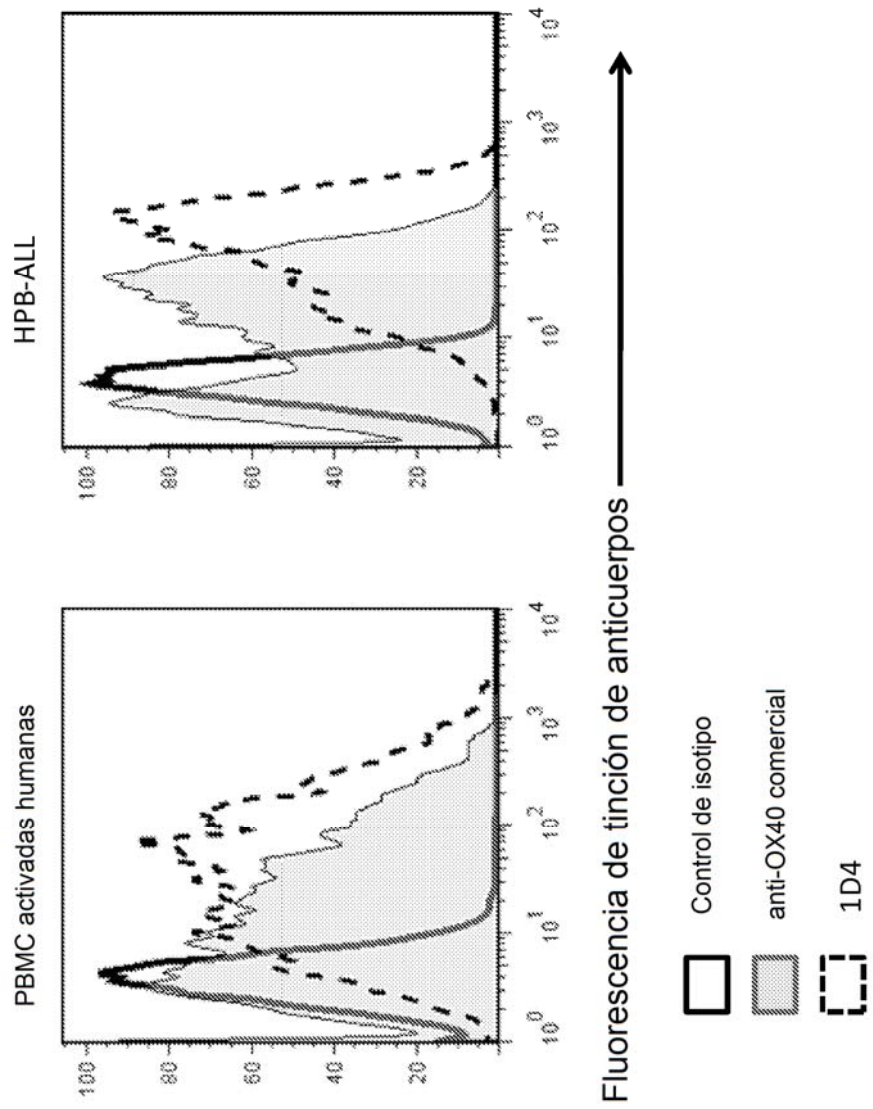


FIG. 3B

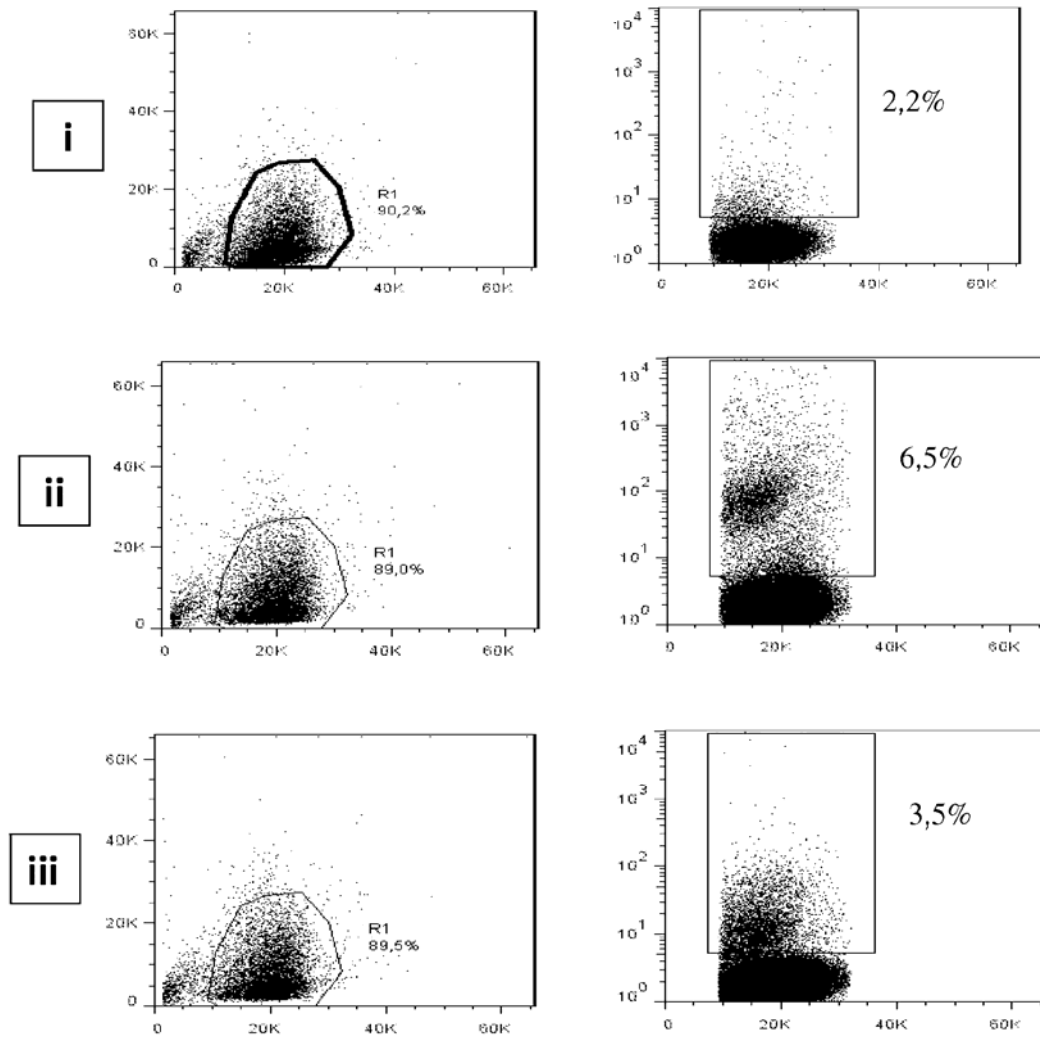


FIG. 4A

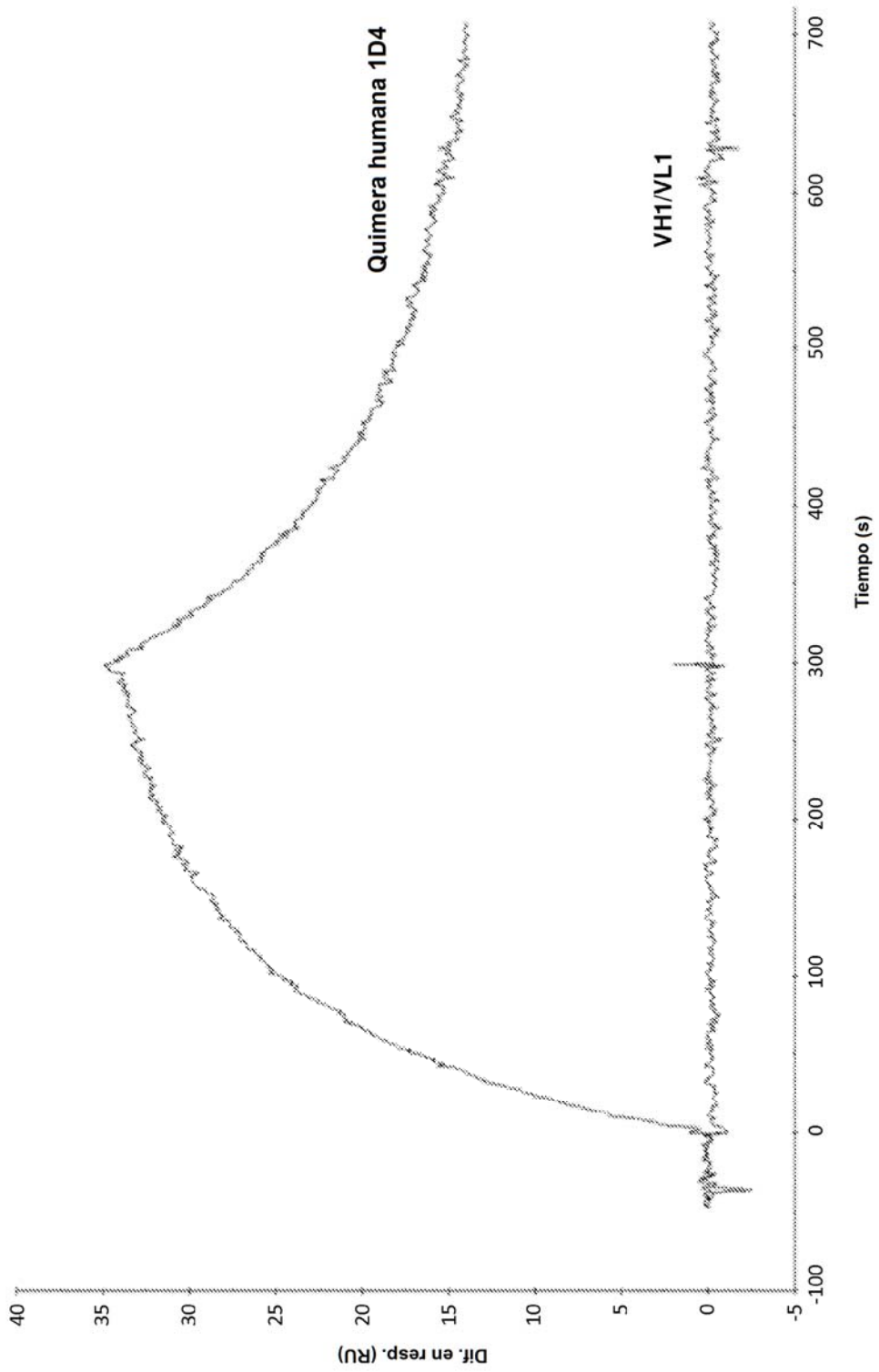


FIG. 4B

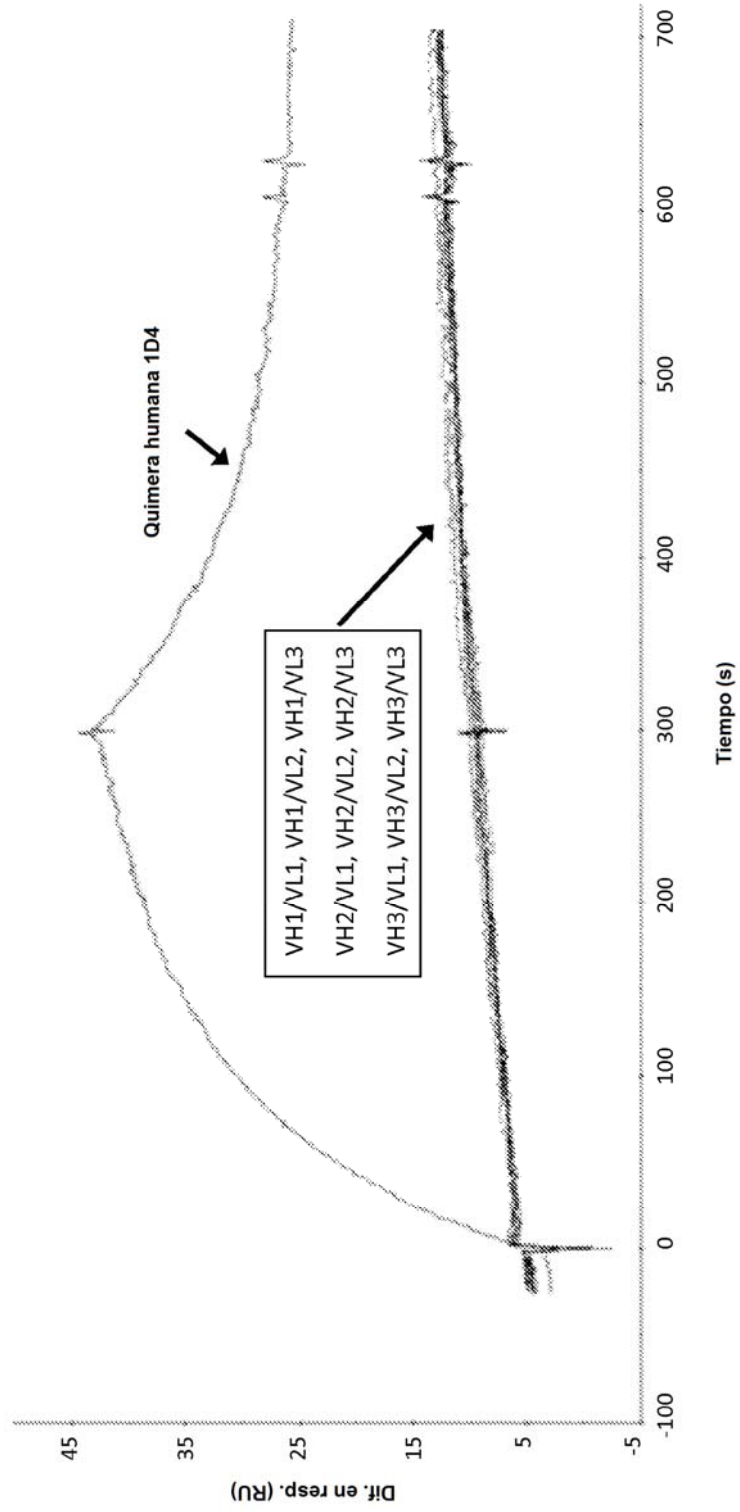


FIG. 4C

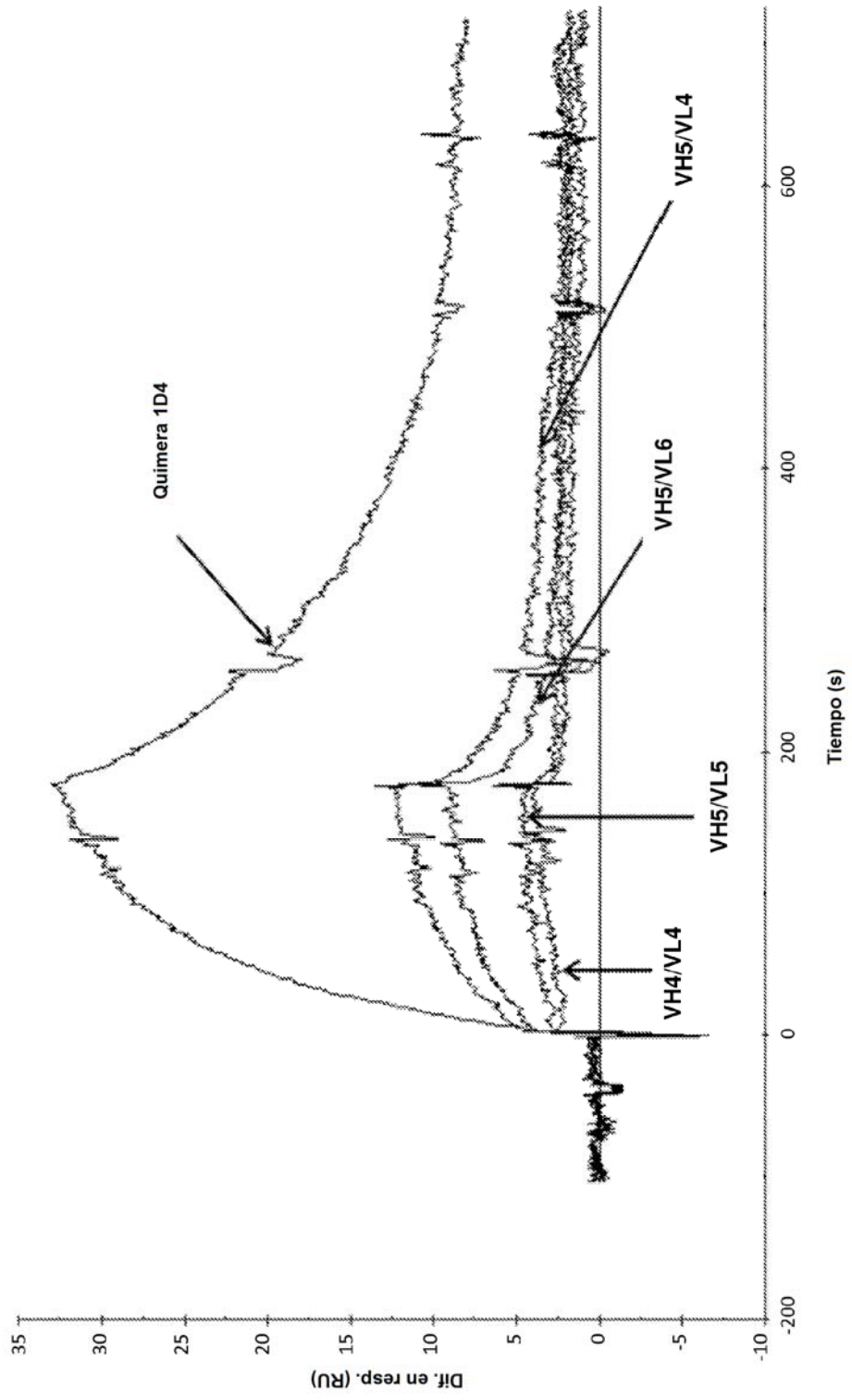


FIG. 4D

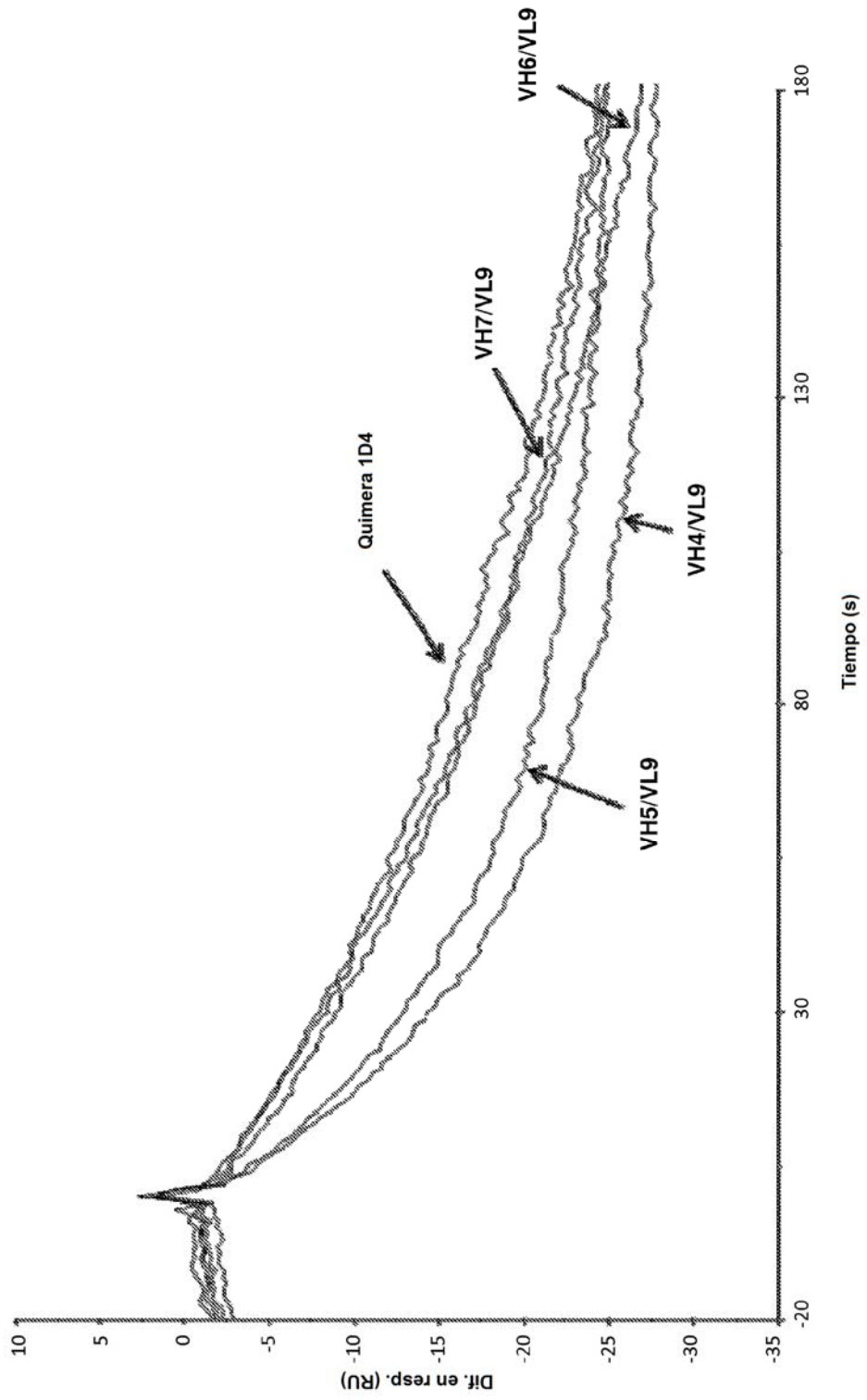


FIG. 4E

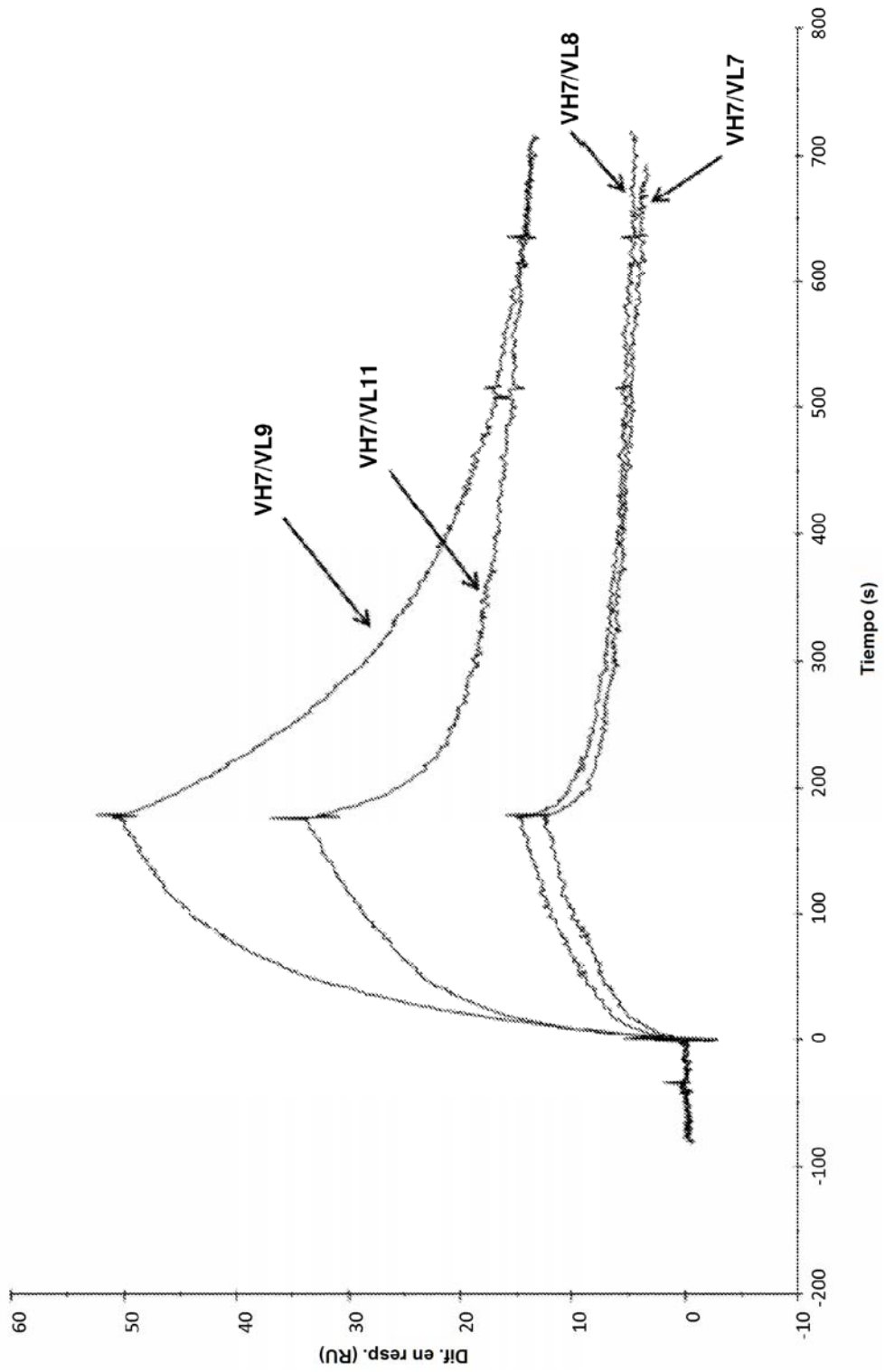


FIG. 4F

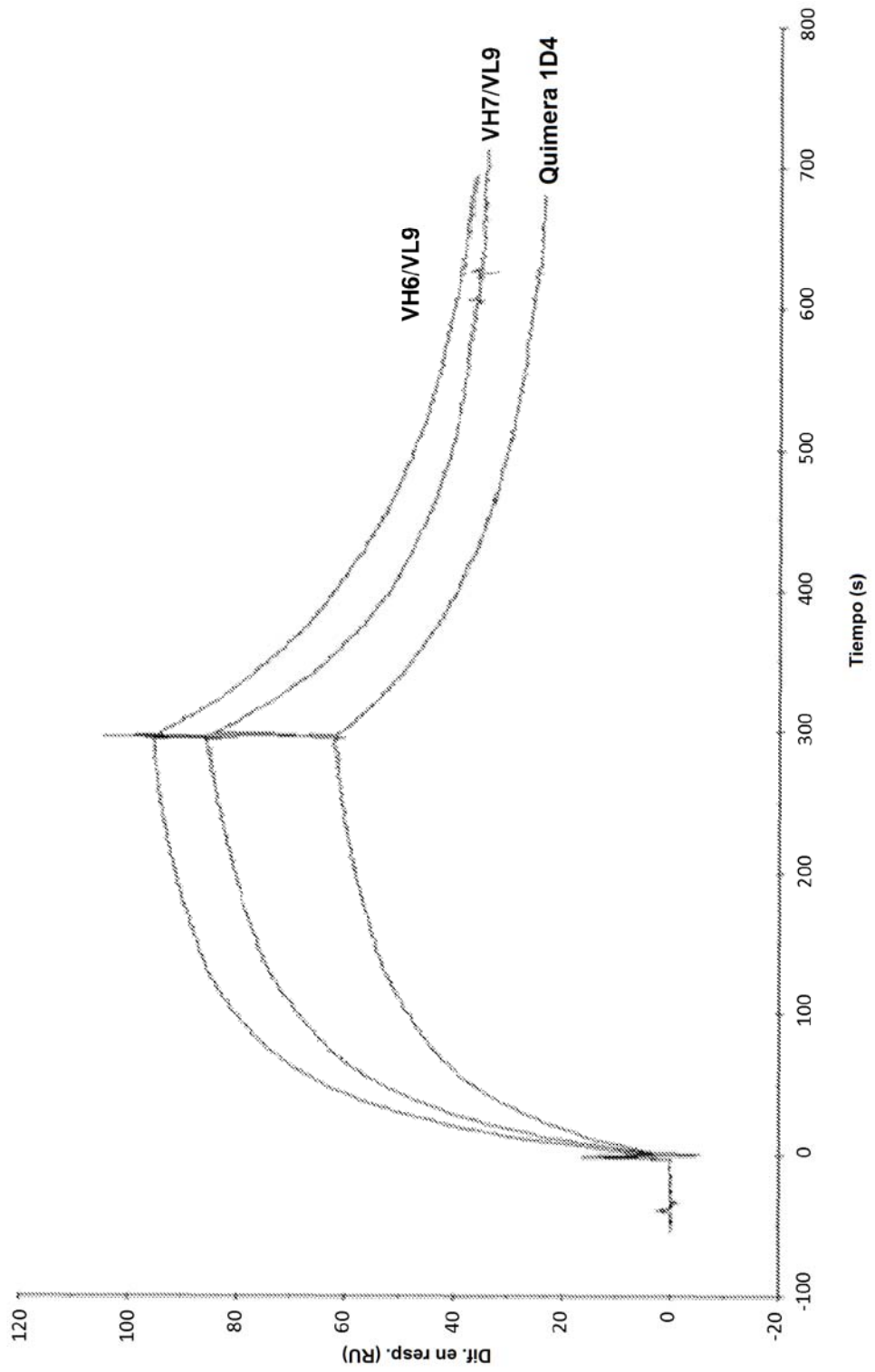


FIG. 6

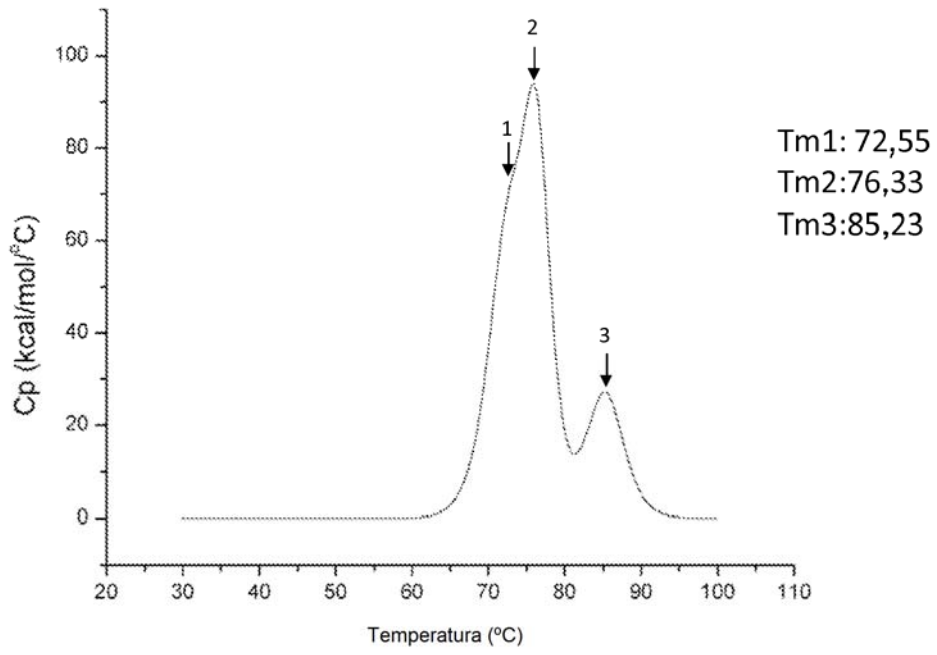


FIG. 7

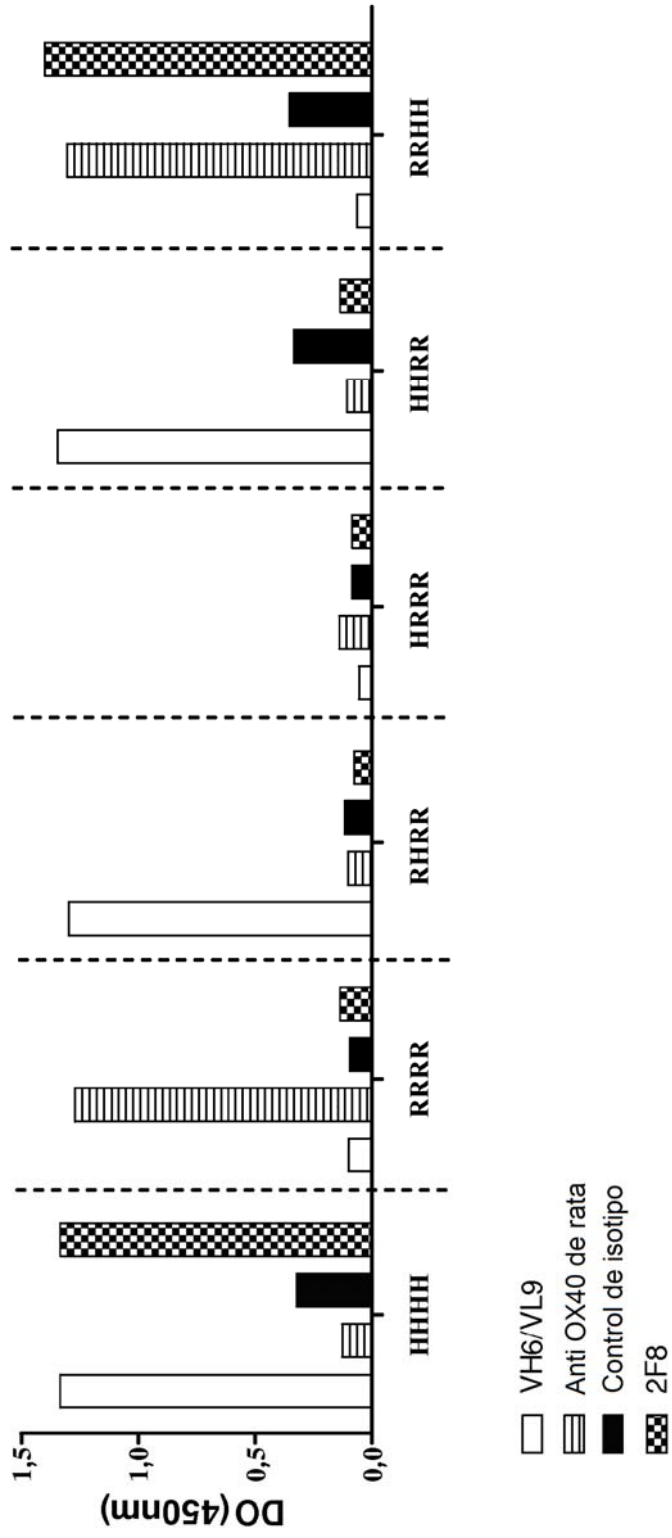


FIG. 8A

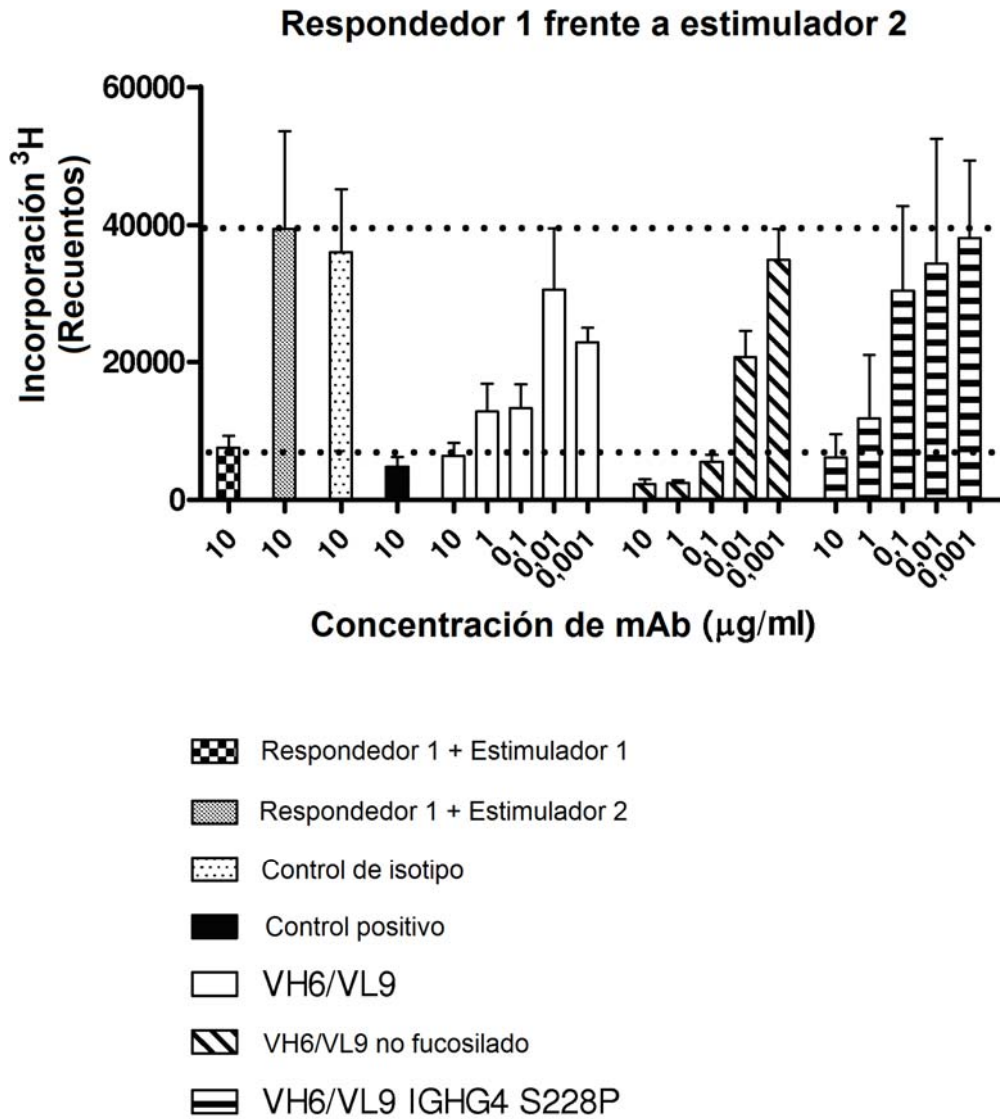
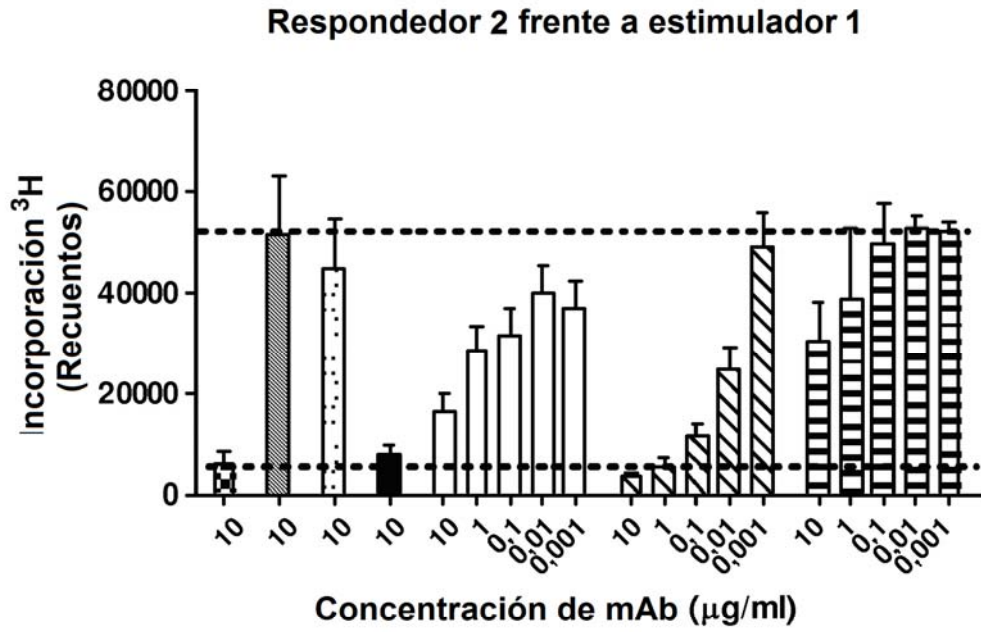


FIG. 8B



- Respondedor 2 + Estimulador 2
- Respondedor 2 + Estimulador 1
- Control de isotipo
- Control positivo
- VH6/VL9
- VH6/VL9 no fucosilado
- VH6/VL9 IGHG4 S228P

FIG. 9

