

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 648**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2011 PCT/IB2011/053761**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2012 WO12032433**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2011 E 11764859 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2614082**

54 Título: **Moléculas de unión a 4-1BB**

30 Prioridad:

09.09.2010 US 381210 P

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

12.02.2019

73 Titular/es:

**PFIZER INC. (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

**AHRENS, BIANCA;
BAXI, SANGITA M.;
BERGQVIST, SIMON PAUL;
DOYONNAS, REGIS;
DUFIELD, ROBERT LEE;
ELLIOTT, MARK WILLIAM;
FISHER, TIMOTHY SCOTT;
JEROME, RICHARD MICHAEL;
JONES, HEATHER LAURENCE;
KAMPERSCHROER, CRIS;
LADETZKI-BAEHS, KATHRIN;
LOVE, VICTORIA ALEXANDRIA;
OLIPHANT, THEODORE LAWRENCE;
ONADIPE, ADEKUNLE OLATUNBOSUN;
QIN, WENNING;
RADHAKRISHNAN, VINAY;
ROHNER, ALLISON KARLYN;
SHARP, LESLIE LYNNE;
TESAR, MICHAEL;
THOMAS, KRISTIN ELIZABETH;
YATES, LIBBEY ANNE;
ZIEGEMEIER, DAISY MARIE y
ZULLEY, MORITZ**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 699 648 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

Moléculas de unión a 4-1BB

Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a anticuerpos y particularmente a anticuerpos que se unen a 4-1BB humano.

5 **Antecedentes**

4-1BB (también denominado CD137, TNFRSF9, etc.) es una proteína transmembrana de la superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNFRFS). El conocimiento actual de 4-1BB indica que la expresión depende en general de la activación y está presente en un subconjunto amplio de células inmunes incluyendo células NKT y NK activadas, linfocitos T reguladores, células dendríticas (DC), mastocitos estimulados, células mieloides en diferenciación, monocitos, neutrófilos y eosinófilos (Wang, 2009, Immunological Reviews 229: 192-215). También se ha demostrado expresión de 4-1BB en vasculatura tumoral (Broll, 2001, Amer. J Clin. Pathol. 115(4):543-549; Seaman, 2007, Cancer Cell 11: 539-554) y en sitios de endotelio aterosclerótico o inflamado (Drenkard, 2007 FASEB J. 21: 456-463; Olofsson, 2008, Circulation 117: 1292-1301). El ligando que estimula 4-1BB, es decir, ligando de 4-1BB (4-1BBL), se expresa en células presentadoras de antígeno activadas (APC), células progenitoras mieloides y células madre hematopoyéticas.

4-1BB humano es una proteína de 255 aminoácidos (N.º de Ref. NM_001561; NP_001552). La secuencia de aminoácidos de 4-1BB humano completa se proporciona en SEQ ID NO: 68. La proteína comprende una secuencia señal (restos aminoacídicos 1-17), seguido de un dominio extracelular (169 aminoácidos), una región transmembrana (27 aminoácidos) y un dominio intracelular (42 aminoácidos) (Cheuk ATC y col. 2004 Cancer Gene Therapy 11: 215-226). El receptor se expresa en la superficie celular en formas monoméricas y diméricas y probablemente trimeriza con ligando de 4-1BB para la señal.

Numerosos estudios de linfocitos T humanos y murinos indican que 4-1BB promueve la proliferación celular potenciada, supervivencia y producción de citocinas (Croft, 2009, Nat Rev Immunol 9:271-285). Estudios han indicado que algunos mAb agonistas de 4-1BB aumentan la expresión molecular coestimuladora y potencian notablemente las respuestas de linfocitos T citotóxicos, dando como resultado eficacia antitumoral en diversos modelos. Los mAb agonistas de 4-1BB han demostrado eficacia en ambientes profilácticos y terapéuticos. Además, los modelos de monoterapia de 4-1BB y terapia de combinación de tumores han establecido respuestas de memoria de linfocitos T protectoras antitumorales duraderas (Lynch, 2008, Immunol Rev. 22: 277-286). También se ha mostrado que los agonistas de 4-1BB inhiben reacciones autoinmunes en una diversidad de modelos de autoinmunidad reconocidos en la técnica (Vinay, 2006, J Mol Med 84:726-736). Esta actividad dual de 4-1BB ofrece el potencial para proporcionar actividad antitumoral mientras amortigua los efectos secundarios autoinmunes que pueden asociarse con enfoques de inmunoterapia que rompen la tolerancia inmune.

El documento WO2005/035584 desvela un mAb 20H4.9 agonista humano que se une a CD137 de ser humano y de mono, pero no al de ratón. Logan y col. (Journal of Immunotherapy, 31 (9), noviembre de 2008, página 956) desvelan un agonista humano contra CD137 para el tratamiento del cáncer.

Existe una necesidad largamente sentida no satisfecha de anticuerpos que se unen a 4-1BB humano, aumenten una respuesta mediada por 4-1BB y proporcionen por lo tanto un agente terapéutico potencial para el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones, incluyendo cáncer.

Sumario

Es un objeto de la divulgación proporcionar una molécula de unión aislada que se une a 4-1BB humano, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo, o derivado del mismo. Es otro objeto de la divulgación proporcionar una composición que comprende una molécula de unión que se une a 4-1BB. También es un objeto de la presente divulgación proporcionar procedimientos para tratar una enfermedad y/o afección asociada con o mediada por señalización de 4-1BB usando una o más moléculas de unión de la divulgación. Estos y otros objetos de la divulgación se describen más completamente en el presente documento.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona anticuerpos aislados que se unen a 4-1BB humano.

Basándose en la divulgación presentada en el presente documento, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado, o parte de unión a antígeno del mismo, que se une a 4-1BB humano, en el que dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno comprende:

- 50 (a) una H-CDR1 como se expone en la SEQ ID NO: 29;
 (b) una H-CDR2 como se expone en la SEQ ID NO: 30;
 (c) una H-CDR3 como se expone en la SEQ ID NO: 31;
 (d) una L-CDR1 como se expone en la SEQ ID NO: 34;
 (e) una L-CDR2 como se expone en la SEQ ID NO: 35; y

(f) una L-CDR3 como se expone en la SEQ ID NO: 36.

En otro aspecto particular, el anticuerpo aislado se une a 4-1BB humano con una K_D de 600 nM o menos, 100 nM o menos, 50 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos o 1 nM o menos, para el dominio extracelular de 4-1BB humano según se midió con el ensayo de BIAcore descrito en la presente divulgación.

5 En un aspecto particular adicional, el anticuerpo aislado comprende una secuencia de aminoácidos de cadena V_H como se expone en SEQ ID NO: 43.

En un aspecto particular adicional, el anticuerpo aislado comprende una secuencia de aminoácidos de cadena V_L como se expone en SEQ ID NO: 45

10 En un aspecto particular adicional, el anticuerpo aislado comprende una secuencia de aminoácidos de dominio V_H como se expone en SEQ ID NO: 43 y comprende adicionalmente una secuencia de aminoácidos de dominio V_L como se expone en SEQ ID NO: 45.

15 En un aspecto particular adicional, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a 4-1BB humano, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de, o deriva de, un gen V_H 3-23, gen V_H 1-69 o V_H 5 humanos. En otro aspecto particular, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a 4-1BB humano que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de, o deriva de, un gen V_L λ 3 o λ 1-13 humano.

En algunas realizaciones, los anticuerpos aislados descritos en el presente documento tienen una o más de las siguientes propiedades o características:

- 20 a) se unen específicamente a 4-1BB humano;
 b) se unen a 4-1BB de cynomolgus y humano;
 c) se unen a 4-1BB humano o 4-1BB de cynomolgus pero no 4-1BB de rata o de ratón;
 d) son una IgG, tal como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4; y
 e) son anticuerpos humanos o anticuerpos humanizados.

25 En algunos otros aspectos, la presente divulgación proporciona una parte de unión a antígeno de cualquiera de los anticuerpos proporcionados por la presente divulgación. En algunas realizaciones, la parte de unión a antígeno es fragmento Fab o scFv.

En algunos aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona un derivado de cualquiera de los anticuerpos proporcionados por la presente divulgación.

30 En algunos otros aspectos, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de la invención.

En algunos aspectos adicionales, la invención proporciona un vector que comprende cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento. En un aspecto adicional más, la invención proporciona una célula huésped que comprende cualquiera de los vectores descritos en el presente documento. Tales células huésped pueden ser bacterianas o de mamífero.

35 En algunos aspectos adicionales, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, o una composición farmacéutica, para su uso en el tratamiento del crecimiento celular anómalo en un sujeto. En un aspecto adicional más, la divulgación proporciona una molécula de unión, o una composición farmacéutica, como se describe en el presente documento, para su uso en el tratamiento de metástasis de células tumorales en un sujeto que lo necesite. En un aspecto adicional más, la divulgación proporciona un uso de cualquiera de las moléculas de unión, o una composición farmacéutica descrita en el presente documento, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de metástasis de células tumorales en un sujeto que lo necesite.

Breve descripción de los dibujos

45 La Figura 1 son cuatro gráficos de barras que muestran la intensidad de fluorescencia media de PBMC primarias no estimuladas (negro) y estimuladas con PHA (gris claro) de seres humanos (arriba a la izquierda), cynomolgus (arriba a la derecha), perro (abajo a la izquierda) y rata (abajo a la derecha) incubadas con el anticuerpo de 4-1BB indicado o anticuerpo control conjugado con Alexaflúor 647. El panel demuestra unión a PBMC humanas y de cynomolgus estimuladas con PHA.

50 La Figura 2 son dos gráficos de líneas que muestran actividad indicadora de luciferasa en células 293T que expresan 4-1BB que se han estimulado con varias concentraciones de mAb específico de 4-1BB o mAb control de isotipo. El panel izquierdo demuestra actividad indicadora en células que expresan 4-1BB de cynomolgus. El panel derecho demuestra actividad en células que expresan 4-1BB humano. Los datos se expresan como estimulación en veces por encima del control de isotipo.

La Figura 3 (3A y 3B) son gráficos de líneas que muestran la concentración de IL-2 humana presente en el medio de cultivo celular después de 72 horas de estimulación de linfocitos T humanos con anti-CD3 y varias concentraciones de anticuerpos de 4-1BB. Cada panel (A y B) representa un donante individual.

La Figura 4 es un diagrama de dispersión que muestra la expansión de células mononucleares de sangre periférica humana en ratones que se han tratado con mAb de 4-1BB o mAb control de isotipo. Los datos se expresan como el porcentaje de células que expresan CD45 humano en la sangre periférica de ratones NSG individuales en los días del estudio 24-28 a los que se había inyectado seis millones de células mononucleares de sangre periférica humana el día 0 y se había inyectado mAb 4-1BB o mAb control de isotipo 1 mg/kg el día 9. La significación estadística se determinó usando un ensayo de Mann-Whitney de dos colas * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$. Sin HBPT se refiere a animales a los que no se inyectó células humanas.

La Figura 5 son dos gráficos de barras que muestran el cambio en linfocitos T de memoria centrales CD8 proliferantes en varios puntos temporales después de la administración de mAb de 4-1BB en monos cynomolgus. Los datos se muestran como columnas que representan animales individuales designados como (nivel de dosis-número de animal) y se representan como cambio intra-animal en el número de células Ki-67+ en relación con el número pre estudio {[número de células Ki-67+ en el día del estudio indicado - número de células Ki-67+ en predosis]/número de células Ki-67+ en predosis}*100}. Las células de memoria centrales CD8 se identificaron como CD3+, CD8+, CD28+ y CD95+.

La Figura 6 son gráficos de línea que muestran el crecimiento de tumores a los que se había inyectado células tumorales por vía subcutánea (PC3, panel izquierdo; LOVO, panel derecho) y células mononucleares de sangre periférica humana el día de estudio 0. Se inyectó a los ratones 10 mg/kg de los mAb 4-1BB indicados en el día 0.

La Figura 7 panel izquierdo es un diagrama de dispersión que muestra el porcentaje de PBMC que son positivas para el marcador de superficie de linfocitos T CD8+ y han incorporado el análogo de nucleósido BrdU después de tratamiento de ratones knock in 4-1BB con mAb de 4-1BB o control de vehículo. El panel derecho es un gráfico de líneas que muestra el crecimiento de tumores de melanoma murino inyectados por vía subcutánea en ratones knock in 4-1BB y tratados con la concentración indicada de mAb de 4-1BB.

La Figura 8 muestra alineamientos de secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y las regiones variables de cadena ligera (con las CDR subrayadas) con secuencias de línea germinal relevantes.

Descripción detallada

A. Definiciones

A no ser que se defina de otro modo en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente divulgación tendrán los significados que se entienden habitualmente por los expertos en la materia. Además, a no ser que se requiera de otro modo por contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas usadas en relación con, y técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de ácido nucleico y proteínas e hibridación descritas en el presente documento son las bien conocidas y habitualmente usadas en la materia.

Como se usa en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado con él en esta sección.

La expresión "anticuerpo de 4-1BB" se refiere a un anticuerpo, como se define en el presente documento, capaz de unirse al receptor 4-1BB humano.

Las expresiones "4-1BB" y "receptor 4-1BB" se usan de forma intercambiable en la presente solicitud e incluyen el receptor 4-1BB humano, así como variantes, isoformas y homólogos de especie del mismo. En consecuencia, una molécula de unión, como se define y se desvela en el presente documento, también puede unirse a 4-1BB de especies distintas del ser humano. En otros casos, una molécula de unión puede ser completamente específica para 4-1BB humano y puede no mostrar reactividad cruzada de especie o de otro tipo.

Los artículos "un" y "una" se refieren a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. Como ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

El término "agonista" se refiere a una molécula de unión, como se describe en el presente documento, que tras unión a 4-1BB, (1) estimula o activa 4-1BB, (2) potencia, aumenta, promueve, induce o prolonga una actividad, función o presencia de 4-1BB o (3) potencia, aumenta, promueve o induce la expresión de 4-1BB.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos sintéticos y de origen natural, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que actúan de forma similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina. La expresión "análogos de aminoácidos" se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural pero el grupo carboxi C-terminal, el grupo amino N-terminal o el grupo funcional de cadena lateral se ha modificado químicamente a otro grupo funcional. La expresión "miméticos de aminoácidos" se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que

actúa de forma similar a un aminoácido de origen natural.

El término “anticuerpo” es un término reconocido en la técnica y se refiere a una proteína de unión a antígeno (es decir, inmunoglobulina) que tiene una estructura de cadena de cuatro polipéptidos básica que consiste en dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas ligeras (L) idénticas. Cada cadena L se une a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de cadena H. Cada cadena pesada tiene, en el extremo N-terminal, una región variable (abreviada en el presente documento como V_H) seguido de una región constante. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera tiene, en el extremo N-terminal, una región variable (abreviada en el presente documento como V_L) seguido de una región constante en su otro extremo. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, C_L . La V_L se alinea con la V_H y el C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada ($CH1$). El emparejamiento de una V_H y V_L juntas forma un sitio de unión a antígeno sencillo. Un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J y por lo tanto contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades de 4 cadenas básicas junto con cadena J.

Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones flanqueantes (FR). Las regiones CDR pueden determinarse usando los sistemas de numeración de Kabat o Chothia, ambos de los cuales se conocen bien por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Kabat, E. A., y col. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación de NIH N.º 91-3242; Chothia y Lesk, J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDR y cuatro FR dispuestas de amino terminal a carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. A lo largo de la presente divulgación, las tres CDR de la cadena pesada se denominan H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3. De forma similar, las tres CDR de la cadena ligera se denominan L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos huésped o factores, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variables y constantes se unen por una región “J” de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región “D” de aproximadamente 10 o más aminoácidos. Véase, en general, *Fundamental Immunology* C. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

La cadena L de cualquier especie de vertebrado puede asignarse a uno o dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), los anticuerpos pueden asignarse a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α (alfa), σ (delta), ϵ (épsilon), γ (gamma) y μ (mu), respectivamente. La clase IgG de anticuerpo puede clasificarse adicionalmente en cuatro subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 por las cadenas pesadas gamma Y1 – Y4, respectivamente.

La expresión “derivado de anticuerpo” o “derivado” de un anticuerpo se refiere a una molécula que es capaz de unirse al mismo antígeno (por ejemplo, 4-1BB) al que se une el anticuerpo y comprende una secuencia de aminoácidos del anticuerpo ligada a una entidad molecular adicional. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo que está contenida en el derivado de anticuerpo puede ser una cadena pesada de longitud completa, una cadena ligera de longitud completa, cualquier parte o partes de una cadena pesada de longitud completa, cualquier parte o partes de la cadena ligera de longitud completa del anticuerpo, cualquier otro fragmento o fragmentos de un anticuerpo o el anticuerpo completo. La entidad molecular adicional puede ser una molécula química o biológica. Los ejemplos de entidades moleculares adicionales incluyen grupos químicos, aminoácidos, péptidos, proteínas (tales como enzimas, anticuerpos) y compuestos químicos. La entidad molecular adicional puede tener cualquier utilidad, tal como para su uso como un agente de detección, etiqueta, marcador, agente farmacéutico o terapéutico. La secuencia de aminoácidos de un anticuerpo puede unirse o ligarse a la entidad molecular adicional por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo. La expresión “derivado de anticuerpo” también abarca anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y moléculas que derivan de modificaciones de las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo de 4-1BB, tal como sustituciones, adiciones e inserciones de aminoácidos.

La expresión “fragmento de unión a antígeno” o “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo se refiere a una o más partes de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse al antígeno al que se une el anticuerpo (por ejemplo, 4-1BB). Los ejemplos de “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de una rama sencilla de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y col., *Nature* 341:544-546 (1989)), que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada.

La expresión “molécula de unión” abarca (1) anticuerpo, (2) fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo y (3) derivado de un anticuerpo, cada uno como se ha definido en el presente documento.

La expresión “uniendo 4-1BB”, “une 4-1BB”, “uniéndose a 4-1BB” o “se une a 4-1BB” se refiere a la unión de una molécula de unión, como se ha definido en el presente documento, al 4-1BB humano en un ensayo *in vitro*, tal como un ensayo BIAcore como se describe en el Ejemplo 6, con una afinidad (K_D) de 500 nM o menos.

La expresión “anticuerpo quimérico” se refiere a un anticuerpo que comprende secuencias de aminoácidos derivadas de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un anticuerpo humano y una región constante de inmunoglobulina murina.

La expresión “competir por la unión” se refiere a la interacción de dos anticuerpos en su unión con una diana de unión. Un primer anticuerpo compite por unión con un segundo anticuerpo si la unión del primer anticuerpo con su epítipo afín se reduce de forma detectable en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, en la que la unión del segundo anticuerpo con su epítipo también se reduce de forma detectable en presencia del primer anticuerpo, puede darse, pero no es necesario. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo con su epítipo sin que el segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo con su epítipo respectivo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de forma detectable la unión del otro anticuerpo con su epítipo afín, en el mismo, mayor o menor grado, se dice que los anticuerpos “compiten de forma cruzada” entre sí por la unión de su epítipo o epítopos respectivos.

El término “epítipo” se refiere a una parte de un antígeno a la que se une un anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo). Los epítopos pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se conservan típicamente en exposición a disolventes desnaturalizantes mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario típicamente se pierden tras tratamiento con disolventes desnaturalizantes. Un epítipo puede incluir diversos números de aminoácidos en una conformación espacial única. Los procedimientos para determinar la conformación espacial de epítopos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996). Una vez que se determina un epítipo deseado en un antígeno, puede generarse anticuerpos para ese epítipo, por ejemplo, usando las técnicas descritas en el presente documento. La generación y caracterización de anticuerpos también puede dilucidar información acerca de epítopos deseables. A partir de esta información, es posible después explorar de forma competitiva anticuerpos con respecto a unión al mismo epítipo. Un enfoque para conseguir esto es realizar estudios de competición cruzada para encontrar anticuerpos que se unan de forma competitiva entre sí, es decir, los anticuerpos compiten por unión al antígeno. Se describe un procedimiento de alto rendimiento para “agrupamiento” de anticuerpos basándose en su competición cruzada en la Publicación de PCT N.º WO 03/48731.

La expresión “línea germinal” se refiere a las secuencias de nucleótidos de los genes y segmentos génicos de anticuerpo a medida que pasan de los padres a la descendencia mediante las células germinales. La secuencia de línea germinal se distingue de las secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos en linfocitos B maduros que se han alterado por acontecimientos de recombinación e hipermutación durante el transcurso de maduración de linfocitos B.

La expresión “sitios de glucosilación” se refiere a restos aminoacídicos que se reconocen por una célula eucariota como localizaciones para la unión de restos de azúcar. Los aminoácidos en los que se une un carbohidrato, tal como oligosacárido, son típicamente restos de asparagina (engarce N), serina (engarce O) y treonina (engarce O). El sitio específico de unión se señala típicamente por una secuencia de aminoácidos, denominada en el presente documento “secuencia de sitio de glucosilación”. La secuencia de sitios de glucosilación para glucosilación ligada a N es: -Asn-X-Ser o -Asn-X-Thr-, en la que X puede ser cualquiera de los aminoácidos convencionales, distinto de prolina. Las expresiones “ligado a N” y “ligado a O” se refiere al grupo químico que sirve como el sitio de unión entre la molécula de azúcar y el resto aminoacídico. Los azúcares ligados a N se unen a través de un grupo amino; los azúcares ligados a O se unen a través de un grupo hidroxilo. La expresión “ocupación de glucano” se refiere a la existencia de un resto carbohidrato ligado a un sitio de glucosilación (es decir, el sitio glucano está ocupado). Cuando existen al menos dos sitios de glucosilación potenciales en un polipéptido, pueden estar ocupados ninguno (ocupación de sitio de glucano 0), uno (ocupación de sitio de glucano 1) o ambos (ocupación de sitio de glucano 2) sitios por un resto carbohidrato.

La expresión “célula huésped” se refiere a un sistema celular que puede modificarse por ingeniería genética para generar proteínas, fragmentos de proteínas o péptidos de interés. Las células huésped incluyen, sin limitación, células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero derivadas de roedores (ratas, ratones, cobayas o hámsteres) tales como CHO, BHK, NSO, SP2/0, YB2/0; o tejidos humanos o células de hibridoma, células de levadura y células de insectos y células comprendidas dentro de un animal transgénico o tejido cultivado. El término abarca no solamente la célula objeto particular sino también la descendencia de una célula tal. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones posteriores debido a mutación o influencias ambientales, dicha descendencia puede no ser idéntica a la célula parental, pero aún están incluidas dentro del ámbito de la expresión

“célula huésped”.

La expresión “anticuerpo humano” se refiere a un anticuerpo en el que las secuencias de aminoácidos completas de las cadenas ligeras y cadenas pesadas son de los genes de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humano puede contener cadenas de carbohidrato murinas si se produce en un ratón, en una célula de ratón o en un hibridoma derivado de una célula de ratón. Los anticuerpos humanos pueden prepararse de una diversidad de maneras conocidas en la técnica.

La expresión “anticuerpo humanizado” se refiere a un anticuerpo quimérico que contiene restos aminoácidos derivados de secuencias de anticuerpo humanas. Un anticuerpo humanizado puede contener algunas o todas las CDR de un anticuerpo animal no humano mientras que las regiones flanqueantes y constantes del anticuerpo contienen restos aminoácidos derivados de secuencias de anticuerpos humanos.

La expresión “anticuerpo ilustrativo” se refiere a uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la divulgación y designados MOR-6032, MOR-7361, MOR-7480, MOR-7480.1, MOR-7480.2, MOR-7483, MOR-7483.1 y MOR-7483.2. Estos anticuerpos pueden estar en cualquier clase (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM). Por lo tanto, cada anticuerpo identificado anteriormente abarca anticuerpos en las cinco clases que tienen las mismas secuencias de aminoácidos para las regiones V_L y V_H . Además, los anticuerpos en la clase IgG pueden estar en cualquier subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Por lo tanto, cada anticuerpo identificado anteriormente en la subclase IgG abarca anticuerpos en las cuatro subclases que tienen las mismas secuencias de aminoácidos para las regiones V_L y V_H . Las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de cadena pesada de anticuerpos humanos en las cinco clases, así como en las cuatro subclases de IgG se conocen en la técnica. Como ejemplos, las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes IgG1 e IgG2 humanas se proporcionan en SEQ ID NO: 69 y 71, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa para la subclase IgG2 de cada uno de los anticuerpos ilustrativos se proporciona en la divulgación.

La expresión “anticuerpo aislado” o “molécula de unión aislada” se refiere a un anticuerpo o a una molécula de unión, como se ha definido en el presente documento, que: (1) no está asociada con componentes asociados de forma natural que le acompañen en su estado nativo; (2) está sin otras proteínas de la misma especie; (3) se expresa por una célula de una especie diferente; o (4) no aparece en la naturaleza. Los ejemplos de anticuerpos aislados incluyen un anticuerpo de 4-1BB cuya afinidad se ha purificado usando 4-1BB, un anticuerpo de 4-1BB que se ha generado por hibridomas u otra línea celular *in vitro* y un anticuerpo de 4-1BB derivado de un animal transgénico.

La expresión “ácido nucleico aislado” se refiere a una molécula de ácido nucleico de origen genómico, ADNc o sintético, o una combinación de los mismos, que se separa de otras moléculas de ácido nucleico presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Por ejemplo, con respecto a ADN genómico, el término “aislado” incluye moléculas de ácido nucleico que se separan del cromosoma con el que el ADN genómico está asociado de forma natural. Preferentemente, un ácido nucleico “aislado” está sin secuencias que flanquean de forma natural el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico de interés).

El término “ k_a ” se refiere a la constante de tasa de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término “ k_d ” se refiere a la constante de tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

El término “ K_D ” se refiere a la constante de disociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Se obtiene de la relación de k_d a k_a (es decir, k_d/k_a) y se expresa como una concentración molar (M). K_D se usa como una medida de la afinidad de unión de un anticuerpo a su compañero de unión. Cuanto menor sea la K_D , más estrechamente está unido el anticuerpo, o mayor es la afinidad entre el anticuerpo y el antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo con una constante de disociación nanomolar (nM) se une más estrechamente a un antígeno particular que un anticuerpo con una constante de disociación micromolar (μ M). Los valores de K_D para anticuerpos pueden determinarse usando procedimientos bien establecidos en la técnica. Un procedimiento para determinar la K_D de un anticuerpo es usando resonancia de plasmón superficial, típicamente usando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®. Un procedimiento de ensayo que usa el sistema BIACORE™ (ensayo BIAcore) se describe en la sección de Ejemplos de la presente divulgación.

El término “mamífero” se refiere a cualquier especie animal de la clase *Mammalia*. Los ejemplos de mamíferos incluyen: seres humanos; animales de laboratorio tales como ratas, ratones, simios y cobayas; animales domésticos tales como gatos, perros, conejos, vacas, ovejas, cabras, caballos y cerdos y animales salvajes cautivos tales como leones, tigres, elefantes y similares.

La expresión “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto para posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un sitio antigénico sencillo. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpo policlonal que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante sencillo en el antígeno.

Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en tanto que pueden sintetizarse no contaminados por otros anticuerpos. El modificador “monoclonal” no debe interpretarse como que requiera producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse por la metodología de hibridoma o pueden realizarse usando procedimientos de ADN recombinante en células bacterianas, eucariotas animales o vegetales (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

La expresión “prevenir” o “que previene”, en referencia a cierta enfermedad en un mamífero, se refiere a prevenir o retardar la aparición de la enfermedad o prevenir la manifestación de síntomas clínicos o subclínicos de la misma.

La expresión “anticuerpo recombinante” se refiere a un anticuerpo que se prepara, expresa, crea o aísla por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal que es transgénico para los genes de inmunoglobulina de otras especies, anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectedo en una célula huésped, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos combinatoria recombinante o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina con otras secuencias de ADN.

Como se usa en el presente documento “identidad de secuencia” entre dos secuencias polipeptídicas indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias. La identidad de secuencia de aminoácidos de polipéptidos puede determinarse convencionalmente usando programas informáticos conocidos tales como Bestfit, FASTA o BLAST (véase, por ejemplo, Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Altschul y col., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschul y col., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)). Cuando se usa Bestfit o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia, los parámetros se ajustan de modo que el porcentaje de identidad se calcule sobre la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia y que se permitan huecos en la homología de hasta 5 % del número total de restos aminoacídicos en la secuencia de referencia. Este procedimiento anteriormente mencionado para determinar el porcentaje de identidad entre polipéptidos es aplicable a todas las proteínas, fragmentos o variantes de los mismos desvelados en el presente documento.

La expresión “que se une específicamente” o “que se une específicamente a” en referencia a la interacción de una molécula de unión, como se define en el presente documento, (por ejemplo, un anticuerpo) con su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno), se refiere a la capacidad de la molécula de unión para diferenciar entre un antígeno de interés de una especie animal y el ortólogo antigénico de una especie animal diferente en un conjunto dado de condiciones. Se dice que una molécula de unión a 4-1BB se une específicamente a 4-1BB humano si se une a 4-1BB humano a una CE50 que esté por debajo del 50 % de la CE50 a la que une a 4-1BB de rata o ratón como se determina en un ensayo *in vitro*. La especificidad de unión de un anticuerpo puede determinarse usando procedimientos conocidos en la técnica. Los ejemplos de tales procedimientos incluyen FACS usando células primarias estimuladas con PHA, transferencias de Western, ensayos de ELISA, RIA, ECL, IRMA y exploraciones peptídicas.

La expresión “se une selectivamente” o “se une selectivamente a”, en referencia a la interacción de una molécula de unión, como se define en el presente documento, (por ejemplo, un anticuerpo) con su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno), se refiere a la capacidad de la molécula de unión de diferenciar entre un antígeno de interés de una especie animal (tal como 4-1BB humano) y un antígeno diferente de la misma especie animal (tal como CD40 humano) en un conjunto de condiciones dadas. Se dice que una molécula de unión a 4-1BB se une selectivamente a 4-1BB humano si se une a 4-1BB humano a una CE50 que está por debajo del 10 % de la CE50 a la que se une a CD40 humano o CD134 humano según se determina en un ensayo *in vitro*.

El término “tratar”, “tratando” o “tratamiento” con referencia a una cierta enfermedad en un mamífero, se refiere a provocar un efecto deseable o beneficioso en el mamífero que tiene la enfermedad. El efecto deseable o beneficioso incluye frecuencia o gravedad reducida de uno o más síntomas de la enfermedad (es decir, crecimiento tumoral y/o metástasis u otro efecto mediado por los números y/o actividad de células inmunes y similares) o la detención o inhibición de desarrollo adicional en la enfermedad, afección o trastorno. En el contexto de tratar cáncer en un mamífero, el efecto deseable o beneficioso puede incluir inhibición de crecimiento adicional o proliferación de células cancerosas, muerte de células cancerosas, inhibición de reparación de cáncer, reducción de dolor asociado con el cáncer o supervivencia mejorada del mamífero. El efecto puede ser subjetivo u objetivo. Por ejemplo, si el mamífero es un ser humano, el ser humano puede observar vigor o vitalidad mejorados o reducción del dolor como síntomas subjetivos de mejora o respuesta a terapia. Como alternativa, el especialista clínico puede observar una reducción del tamaño de tumor o carga tumoral basándose en examen físico, parámetros de laboratorio, marcadores tumorales o hallazgos radiográficos. Algunas señales de laboratorio que el especialista clínico puede observar para respuesta o tratamiento incluyen normalización de ensayos, tales como conteo de glóbulos blancos, conteo de glóbulos rojos, conteo de plaquetas, tasa de sedimentación de eritrocitos y diversos niveles enzimáticos. Adicionalmente, el especialista clínico puede observar una reducción en un marcador tumoral detectable. Como alternativa, pueden usarse otros ensayos para evaluar mejora objetiva, tales como sonogramas, ensayo de resonancia magnética

nuclear y ensayos de emisión de positrones.

El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar una molécula de ácido nucleico ajena. La molécula de ácido nucleico ajena se une a la molécula de ácido nucleico del vector por una técnica recombinante, tal como hibridación o recombinación. Esto permite a la molécula de ácido nucleico ajena multiplicarse, seleccionarse, manipularse adicionalmente o expresarse en una célula u organismo huésped. Un vector puede ser un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, virus o virión. Un tipo de vectores puede integrarse en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la célula huésped y por lo tanto se replican junto con el genoma huésped (por ejemplo, vectores mamíferos no episomales). Otro tipo de vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores mamíferos episomales). Otro tipo específico de vectores capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos ajenos expresables a los que se unen operativamente se denominan habitualmente "vectores de expresión". Los vectores de expresión generalmente tienen secuencias de control que conducen la expresión de los ácidos nucleicos ajenos expresables. Vectores más simples, conocidos como "vectores de transcripción", solamente son capaces de transcribirse pero no de traducirse: pueden replicarse en una célula diana pero no expresarse. El término "vector" abarca todos los tipos de vectores independientemente de su función. Los vectores capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos expresables a los que se unen operativamente se denominan habitualmente "vectores de expresión".

Los procedimientos y técnicas de la presente divulgación se realizan generalmente de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica y como se ha descrito en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva a no ser que se indique de otro modo. Tales referencias incluyen, por ejemplo, Sambrook y Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Approach*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2001), Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (2002), y Harlow y Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1990). Se realizan reacciones enzimáticas y técnicas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se consigue habitualmente en la materia o como se describe en el presente documento. Las nomenclaturas usadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son las bien conocidas y habitualmente usadas en la materia. Se usan técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y suministro y tratamiento de pacientes.

Como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase *Immunology--A Synthesis* (2ª Edición, E. S. Golub y D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)).

B. MOLÉCULAS DE UNIÓN QUE SE UNEN A 4-1BB HUMANO

La presente divulgación proporciona moléculas de unión aisladas que se unen a 4-1BB humano, incluyendo anticuerpos de 4-1BB, fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos de 4-1BB y derivados de los anticuerpos de 4-1BB.

B-1. ANTICUERPOS DE 4-1BB

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a 4-1BB humano en un epítipo dentro de los restos aminoacídicos 115 - 156 de SEQ ID NO: 68. En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado comprende la secuencia de aminoácidos H-CDR1 de SEQ ID NO: 29, la secuencia de aminoácidos H-CDR2 de SEQ ID NO: 30 y la secuencia de aminoácidos H-CDR3 de SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones adicionales, el anticuerpo aislado comprende la secuencia de aminoácidos L-CDR1 de SEQ ID NO: 34, la secuencia de aminoácidos L-CDR2 de SEQ ID NO: 35 y la secuencia de aminoácidos L-CDR3 de SEQ ID NO: 36. En algunas realizaciones adicionales, los anticuerpos descritos en el presente documento anteriormente tienen una o más propiedades biológicas descritas a continuación en el presente documento.

En otros aspectos, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a 4-1BB humano, comprendiendo dicho anticuerpo: (a) una H-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 29; (b) una H-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 30; y (c) una H-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 31.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a 4-1BB humano, comprendiendo dicho anticuerpo: (a) una L-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 34; (b) una L-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 35 y (c) una L-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 55.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a 4-1BB humano, comprendiendo dicho anticuerpo: (a) una H-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 29; (b) una H-CDR2 como se expone SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 30; y (c) una H-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 31 y comprende adicionalmente: (d) una L-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 34; (e) una L-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 7,

SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 35; y (f) una L-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 55.

En algunos aspectos adicionales, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a 4-1BB humano, seleccionándose dicho anticuerpo del grupo que consiste en:

- 5 (a) un anticuerpo que comprende una H-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 1, una H-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 2 y una H-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 3;
 (b) un anticuerpo que comprende una H-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 15, una H-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 16 y una H-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 17; y
 10 (c) un anticuerpo que comprende una H-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 29, una H-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 30 y una H-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 31.

En algunos aspectos adicionales, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a 4-1BB humano, seleccionándose dicho anticuerpo del grupo que consiste en:

- (a) un anticuerpo que comprende una L-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 6, una L-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 7 y una L-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 8;
 15 (b) un anticuerpo que comprende una L-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 20, una L-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 21 y una L-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 22;
 (c) un anticuerpo que comprende una L-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 34, una L-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 35 y una L-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 36; y
 20 (d) un anticuerpo que comprende una L-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 34, una L-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 35 y una L-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 55.

En algunos aspectos adicionales, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une al 4-1BB humano, seleccionándose dicho anticuerpo del grupo que consiste en:

- (a) un anticuerpo que comprende una H-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 1, una H-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 2, una H-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 3; una L-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 6, una L-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 7 y una L-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 8;
 25 (b) un anticuerpo que comprende una H-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 15, una H-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 16, una H-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 17; una L-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 20, una L-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 21 y una L-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 22;
 30 (c) un anticuerpo que comprende una H-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 29, una H-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 30, una H-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 31; una L-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 34, una L-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 35 y una L-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 36; y
 35 (d) un anticuerpo que comprende una H-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 29, una H-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 30, una H-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 31; una L-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 34, una L-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 35 y una L-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 55.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a 4-1BB humano, comprendiendo dicho anticuerpo una secuencia de aminoácidos de cadena V_H como se expone en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 43.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a 4-1BB humano, comprendiendo dicho anticuerpo una secuencia de aminoácidos de cadena V_L como se expone en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 60 o SEQ ID NO: 64.

45 En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a 4-1BB humano, comprendiendo dicho anticuerpo (1) una secuencia de aminoácidos de cadena V_H como se expone en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 43 y (2) una secuencia de aminoácidos de cadena V_L como se expone en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 60 o SEQ ID NO: 64.

50 En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a 4-1BB humano, seleccionándose dicho anticuerpo del grupo que consisten en:

- (a) un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena V_H como se expone en SEQ ID NO: 4 y una secuencia de aminoácidos de cadena V_L como se expone en SEQ ID NO: 9;
 55 (b) un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena V_H como se expone en SEQ ID NO: 18 y una secuencia de aminoácidos de cadena V_L como se expone en SEQ ID NO: 23;
 (c) un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena V_H como se expone en SEQ ID NO: 32 y una secuencia de aminoácidos de cadena V_L como se expone en SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 56; y

(d) un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena V_H como se expone en SEQ ID NO: 43 y una secuencia de aminoácidos de cadena V_L como se expone en SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 60 o SEQ ID NO: 64.

5 En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento anteriormente, incluyendo anticuerpos descritos con referencia a unión de epítopos y anticuerpos descritos con referencia a secuencias de aminoácidos específicas de CDR o regiones variables, tienen al menos una de las siguientes propiedades funcionales: (a) se unen a 4-1BB humano con una K_D de 500 nM o menos; (b) tienen actividad agonista en 4-1BB humano; (c) no se unen a receptor CD40 humano a concentración de hasta 1000 nM; (d) no se unen a receptor CD134 humano a concentraciones de hasta 1000 nM; (e) no se unen a 4-1BB de rata o de ratón a concentraciones de hasta 100 nM; (h) son capaces de inhibir el crecimiento de células tumorales; y (i) tienen efecto terapéutico en un cáncer. En algunas realizaciones adicionales, los anticuerpos se unen específicamente a 4-1BB humano con una K_D de 500 nM o menos, 100 nM o menos, 50 nM o menos, 10 nM o menos o 1 nM o menos, para el dominio extracelular de 4-1BB humano como se mide con el ensayo de BIAcore descrito en la presente divulgación. En más realizaciones adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo humano o anticuerpo humanizado que se une específicamente a 4-1BB con una K_D de 500 nM o menos, 100 nM o menos, 50 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos o 1 nM o menos, para el dominio extracelular de 4-1BB humano como se mide con el ensayo de BIAcore descrito en la presente divulgación. En algunas realizaciones adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo humano que se une específicamente y selectivamente a 4-1BB humano.

20 En otras realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento anteriormente comprenden una región variable de cadena pesada de un gen de inmunoglobulina de cadena pesada de línea germinal particular y/o una región variable de cadena ligera de un gen de inmunoglobulina de cadena ligera de línea germinal particular, tal como un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de, o deriva de, un gen V_H 1-69, gen V_H 3-23 o gen V_H 5 humano. Los anticuerpos ejemplares incluyen MOR-7480.1, MOR-7480.2, MOR-7483.1 y MOR-7483.2, cada uno de los cuales contiene aminoácidos que derivan de gen V_H 5 de línea germinal humano.

25 En otras realizaciones más, los anticuerpos descritos en el presente documento anteriormente comprenden una región variable de cadena ligera que deriva de un gen V_L λ 3 humano. En otra realización más los anticuerpos descritos en el presente documento anteriormente comprenden una región variable de cadena pesada que es el producto de, o deriva de, un gen V_H 1-69, gen V_H 3-23 o gen V_H 5 humano y comprenden adicionalmente una región variable de cadena ligera que es el producto de, o deriva de, un gen V_L λ 3 humano, en el que el anticuerpo o parte del mismo se une específicamente a 4-1BB humano. Los anticuerpos ejemplares incluyen MOR-7480.1, MOR-7480.2, MOR-7483.1 y MOR-7483.2, cada uno de los cuales contiene aminoácidos que derivan del gen V_H 5 y gen V_L λ 3 de línea germinal humana, respectivamente.

30 Como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena ligera o pesada que "derivan de" una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Tales sistemas incluyen inmunizar un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o explorar una biblioteca génica de inmunoglobulina humana presentada en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede identificarse como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana que es más cercana en secuencia (es decir, mayor porcentaje de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas de origen natural o introducción intencionada de mutación dirigida. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado típicamente es al menos 90 % idéntico en secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene restos aminoacídicos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se comparan con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal murinas). En estos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 95 % o incluso al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. En ciertos casos, el anticuerpo humano es idéntico en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de IGF-I de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de línea germinal humana particular no presentará más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede presentar no más de 5 o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Se proporcionan alineamientos de las secuencias de aminoácidos de regiones variables de los anticuerpos ilustrativos y las líneas germinales relevantes en la Figura 6.

60 En otro aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos aislados que compiten o compiten de forma cruzada por unión a 4-1BB humano con cualquiera de los anticuerpos ilustrativos de la divulgación, tales como MOR-6032, MOR-7361, MOR-7480, MOR-7480.1, MOR-7480.2, MOR-7483, MOR-7483.1 o MOR-7483.2. En una realización

particular, la divulgación proporciona anticuerpos aislados que compiten o compiten de forma cruzada por la unión al mismo epítipo en el 4-1BB humano con cualquiera de los anticuerpos ilustrativos de la divulgación. La capacidad de un anticuerpo para competir o competir de forma cruzada por la unión con otro anticuerpo puede determinarse usando ensayos de unión convencionales conocidos en la técnica, tales como análisis de BIAcore, ensayo de ELISA o citometría de flujo. Por ejemplo, puede permitirse a un anticuerpo ilustrativo de la divulgación que se una a 4-1BB humano en condiciones de saturación y después medir la capacidad del anticuerpo de ensayo para unirse al 4-1BB. Si el anticuerpo de ensayo es capaz de unirse al 4-1BB en el mismo momento que el anticuerpo ilustrativo, entonces el anticuerpo de ensayo se une a un epítipo diferente que el anticuerpo ilustrativo. Sin embargo, si el anticuerpo de ensayo no es capaz de unirse al 4-1BB en el mismo momento, entonces el anticuerpo de ensayo se une al mismo epítipo, un epítipo solapante o un epítipo que está en proximidad cercana al epítipo unido al anticuerpo ilustrativo. Este experimento puede realizarse usando diversos procedimientos, tales como ELISA, RIA, FACS o resonancia de plasmón superficial.

Los anticuerpos de 4-1BB descritos en el presente documento pueden estar en cualquier clase, tal como IgG, IgM, IgE, IgA o IgD. Se prefiere que los anticuerpos de 4-1BB estén en la clase IgG, tal como subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, más preferentemente subclase IgG2. Un anticuerpo de 4-1BB puede convertirse de una clase o subclase a otra clase o subclase usando procedimientos conocidos en la técnica. Un procedimiento ejemplar para producir un anticuerpo en una clase o subclase deseada comprende las etapas de aislar un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo de 4-1BB y un ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo de 4-1BB, aislando la secuencia que codifica la región V_H, ligando la secuencia V_H a una secuencia que codifica una región constante de cadena pesada de la clase o subclase deseada, expresando el gen de cadena ligera y la construcción de cadena pesada en una célula y recogiendo el anticuerpo de 4-1BB.

Además, los anticuerpos proporcionados por la presente divulgación pueden ser monoclonales o policlonales, pero preferentemente monoclonales.

Los ejemplos de anticuerpos aislados específicos proporcionados por la presente divulgación incluyen los siguientes anticuerpos ilustrativos: MOR-6032, MOR-7361, MOR-7480, MOR-7480.1, MOR-7480.1, MOR-7480.2, MOR-7483, MOR-7483, MOR-7483.1 y MOR-7483.2. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena pesada, cadena pesada de longitud completa para la subclase IgG2, región variable de cadena ligera y cadena ligera de longitud completa de estos anticuerpos se proporcionan en la presente divulgación; se proporciona un índice de las SEQ ID NO: para estas secuencias en la Tabla 1. Las secuencias de aminoácidos de las CDR de estos anticuerpos ilustrativos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. Índice de SEQ ID NO:

| Anticuerpo | Cadena | Longitud Completa | | Región Variable | |
|------------|--------|-------------------|-------------|-----------------|-------------|
| | | Aminoácidos | Nucleótidos | Aminoácidos | Nucleótidos |
| | | SEQ ID NO | SEQ ID NO | SEQ ID NO | SEQ ID NO |
| MOR-6032 | Pesada | 5 | 13 | 4 | 11 |
| | Ligera | 10 | 14 | 9 | 12 |
| MOR-7361 | Pesada | 19 | 27 | 18 | 25 |
| | Ligera | 24 | 28 | 23 | 26 |
| MOR-7480 | Pesada | 33 | 41 | 32 | 39 |
| | Ligera | 38 | 42 | 37 | 40 |
| MOR-7480.1 | Pesada | 44 | 49 | 43 | 47 |
| | Ligera | 46 | 50 | 45 | 48 |
| MOR-7480.2 | Pesada | 44 | 49 | 43 | 47 |
| | Ligera | 52 | 54 | 51 | 53 |
| MOR-7483 | Pesada | 33 | 41 | 32 | 39 |
| | Ligera | 57 | 59 | 56 | 58 |
| MOR-7483.1 | Pesada | 44 | 49 | 43 | 47 |

(continuación)

| Anticuerpo | Cadena | Longitud Completa | | Región Variable | |
|------------|--------|-------------------|-------------|-----------------|-------------|
| | | Aminoácidos | Nucleótidos | Aminoácidos | Nucleótidos |
| | | SEQ ID NO | SEQ ID NO | SEQ ID NO | SEQ ID NO |
| | Ligera | 61 | 63 | 60 | 62 |
| MOR-7483.2 | Pesada | 44 | 49 | 43 | 47 |
| | Ligera | 65 | 67 | 64 | 66 |

Tabla 2: Secuencia de Aminoácidos de las CDR

| Anticuerpo | CDR | Secuencia | SEQ ID NO |
|--|--------|-------------------|-----------|
| MOR-6032 | H-CDR1 | NSYAIS | 1 |
| | H-CDR2 | GIIPGFGTANYAQKFQG | 2 |
| | H-CDR3 | RKNEEDGGFDH | 3 |
| | L-CDR1 | SGDNLGDYYAS | 6 |
| | L-CDR2 | DDSNRPS | 7 |
| | L-CDR3 | QTWDGTLHFV | 8 |
| MOR-7361 | H-CDR1 | SDYYMH | 15 |
| | H-CDR2 | VISGSGSNTYYADSVKG | 16 |
| | H-CDR3 | RLYAQFEGDF | 17 |
| | L-CDR1 | SGDNIGSKYVS | 20 |
| | L-CDR2 | SDSERPS | 21 |
| | L-CDR3 | QSWDGSISRV | 22 |
| MOR-7480; MOR-7480.1; MOR-7480.2 | H-CDR1 | STYWIS | 29 |
| | H-CDR2 | KIYPGDSYTNYSFQG | 30 |
| | H-CDR3 | RGYGIFDY | 31 |
| | L-CDR1 | SGDNIGDQYAH | 34 |
| | L-CDR2 | QDKNRPS | 35 |
| | L-CDR3 | ATYTGFGSLAV | 36 |
| MOR-7483; MOR-7483.1; MOR-7483.2 | H-CDR1 | STYWIS | 29 |
| | H-CDR2 | KIYPGDSYTNYSFQG | 30 |
| | H-CDR3 | RGYGIFDY | 31 |
| | L-CDR1 | SGDNIGDQYAH | 34 |
| | L-CDR2 | QDKNRPS | 35 |
| | L-CDR3 | STYTFVGFTTV | 55 |

Pueden producirse anticuerpos de la presente divulgación por técnicas conocidas en la materia, incluyendo metodología de anticuerpo monoclonal convencional, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas convencional (Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature 256:495 (1975)), transformación viral u oncogénica de linfocitos B o tecnologías de anticuerpo recombinante como se describen en detalle en el presente documento a

continuación.

La producción de hibridoma es un procedimiento muy bien establecido. El sistema animal habitual para preparar hibridomas es el sistema murino. Se conocen en la técnica protocolos de inmunización y técnicas para aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión. También se conocen compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión. Un procedimiento bien conocido que puede usarse para preparar anticuerpos de 4-1BB humanos proporcionados por la presente divulgación implica el uso de un sistema animal Xenomouse™. Los ratones Xenomouse™ son cepas de ratón obtenidas por ingeniería genética que comprenden grandes fragmentos de loci de cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina humana y son deficientes en producción de anticuerpo de ratón. Véase, por ejemplo, Green y col., Nature Genetics 7:13-21 (1994) y documento WO 2003/040170. El animal se inmuniza con un antígeno de 4-1BB. El antígeno de 4-1BB es 4-1BB aislado y/o purificado, preferentemente 4-1BB. Puede ser un fragmento de 4-1BB, tal como el dominio extracelular de 4-1BB, particularmente un fragmento de dominio extracelular de 4-1BB que comprende los restos aminoacídicos 115 - 156 de SEQ ID NO: 68. Puede llevarse a cabo inmunización de animales por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Se conocen bien en la técnica procedimientos para inmunizar animales no humanos tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, vacas y caballos. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, mencionado anteriormente y la Patente de Estados Unidos N.º 5.994.619. El antígeno de 4-1BB puede administrarse con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Los adyuvantes ejemplares incluyen adyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (dipéptidos de muramilo) o ISCOM (complejos inmunoestimuladores). Después de inmunización de un animal con un antígeno de 4-1BB, se preparan líneas celulares inmortalizadas productoras de anticuerpos aisladas del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y se immortalizan los linfocitos B de ganglio linfático y/o esplénicos. Los procedimientos para immortalizar células incluyen, pero sin limitación, transferirlas con oncogenes, infectarlas con el virus oncogénico, cultivarlas en condiciones que seleccionan células inmortalizadas, someterlas a compuestos mutagénicos o carcinogénicos, fusionarlas con una célula inmortalizada, por ejemplo, una célula de mieloma, e inactivar un gen supresor de tumores. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, mencionado anteriormente. Si se usa fusión con células de mieloma, las células de mieloma preferentemente no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Las células inmortalizadas se exploran usando 4-1BB, una parte del mismo o una célula que expresa 4-1BB. Las células productoras de anticuerpo de 4-1BB, por ejemplo, hibridomas, se seleccionan, clonan y exploran adicionalmente con respecto a características deseables, incluyendo crecimiento robusto, alta producción de anticuerpos y características de anticuerpos deseables, como se analiza posteriormente adicionalmente. Los hibridomas pueden expandirse *in vivo* en animales singénicos, en animales que carecen de sistema inmune, por ejemplo, ratones desnudos, o en cultivo celular *in vitro*. Se conocen bien por los expertos en la materia procedimientos para seleccionar, clonar y expandir hibridomas.

Los anticuerpos de la divulgación también pueden prepararse usando procedimientos de presentación de fagos. Tales procedimientos de presentación de fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica, tales como las bibliotecas HuCAL® como se describen adicionalmente en el Ejemplo 1. Véase también, por ejemplo: Achim Knappik, y col: Fully Synthetic Human Combinatorial Antibody Libraries (HuCAL) Based on Modular Consensus Frameworks and CDRs Randomized with Trinucleotides. J. Mol. Biol. (2000) 296, 57-86

B-2. FRAGMENTOS DE UNIÓN A ANTÍGENO

En algunos aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona fragmentos de unión a antígeno de cualquiera de los anticuerpos de 4-1BB proporcionados por la presente divulgación.

El fragmento de unión a antígeno puede comprender cualquier secuencia del anticuerpo. En algunas realizaciones, el fragmento de unión a antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de: (1) una cadena ligera de un anticuerpo de 4-1BB; (2) una cadena pesada de un anticuerpo de 4-1BB; (3) una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo de 4-1BB; (4) una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo de 4-1BB; (5) una o más CDR (dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR) de un anticuerpo de 4-1BB; o (6) tres CDR de la cadena ligera y tres CDR de la cadena pesada de un anticuerpo de 4-1BB.

En algunas realizaciones particulares, la divulgación proporciona un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo seleccionado de: MOR-6032, MOR-7361, MOR-7480, MOR-7480.1, MOR-7480.2, MOR-7483, MOR-7483.1 o MOR-7483.2.

En algunas realizaciones particulares adicionales, los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo de 4-1BB incluyen: (i) un fragmento Fab, que es un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y C_H1; (ii) un fragmento F(ab')₂, que es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_H1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de una rama sencilla de un anticuerpo; (v) un fragmento de dAb (Ward y col., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio V_H; (vi) una CDR aislada y (vii) un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), que es un polipéptido que comprende una región V_L de un anticuerpo ligado a una región V_H de un anticuerpo. Bird y col., (1988) Science 242:423-426 y Huston y col., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883.

En algunas realizaciones particulares, el fragmento de unión a antígeno es un fragmento de Fab seleccionado del

grupo que consiste en Fab-6032, Fab-7361, Fab-7480 y Fab-7483.

B-3. DERIVADOS DE ANTICUERPOS

En algunos aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona derivados de cualquiera de los anticuerpos de 4-1BB proporcionados por la presente divulgación.

5 En un aspecto, el derivado de anticuerpo se deriva de modificaciones de las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo ilustrativo ("anticuerpo parental") de la divulgación mientras que conserva la estructura molecular global de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo parental. Pueden modificarse secuencias de aminoácidos de cualquier región de las cadenas del anticuerpo parental, tales como regiones flanqueantes, regiones CDR o regiones constantes. Los tipos de modificaciones incluyen sustituciones, inserciones, deleciones o combinaciones de las mismas, de uno o más aminoácidos del anticuerpo parental. En algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo comprende una región V_H que sea al menos 65 %, al menos 75 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 4, 18, 32 o 43. En algunas realizaciones adicionales, el derivado de anticuerpo comprende una región V_L que es al menos 65 %, al menos 75 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 9, 23, 37, 45, 51, 56, 60 o 64. En algunas realizaciones particulares el derivado comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones conservativas o no conservativas y/o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 adiciones y/o deleciones de una secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 4, 18, 32, 43, 9, 23, 37, 45, 51, 56, 60 o 64.

20 Las sustituciones de aminoácidos abarcan tanto sustituciones conservativas como no conservativas. La expresión "sustitución de aminoácido conservativa" significa un reemplazo de un aminoácido con otro aminoácido en el que los dos aminoácidos tienen similitud en ciertas propiedades físico-químicas tales como polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos implicados. Por ejemplo, pueden realizarse típicamente sustituciones dentro de cada uno de los siguientes grupos: (a) aminoácidos no polares (hidrófobos), tales como alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; (b) aminoácidos neutros polares, tales como glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; (c) aminoácidos cargados positivamente (básicos), tales como arginina, lisina e histidina; y (d) aminoácidos cargados negativamente (ácidos), tales como ácido aspártico y ácido glutámico.

30 Las modificaciones pueden realizarse en cualquier posición de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo, incluyendo las CDR, regiones flanqueantes o regiones constantes. En una realización, la presente divulgación proporciona un derivado de anticuerpo que contiene las secuencias CDR de V_H y V_L de un anticuerpo ilustrativo de la presente divulgación, pero contiene secuencias flanqueantes diferentes de las del anticuerpo ilustrativo. Tales secuencias flanqueantes pueden obtenerse de bases de datos públicas de ADN o referencias publicadas que incluyen secuencias génicas de anticuerpo de línea germinal. Por ejemplo, pueden encontrarse secuencias de ADN de línea germinal para genes de región variable de cadena ligera y pesada humanos en la base de datos de Genbank o en la base de datos de secuencias de línea germinal humanas "VBase" (Kabat, E. A., y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación de NIH N.º 91-3242 (1991); Tomlinson, I. M., y col., J. Mol. Biol. 227:776-798 (1992); y Cox, J. P. L. y col., Eur. J. Immunol. 24:827-836 (1994)). Las secuencias flanqueantes que pueden usarse en la construcción de un derivado de anticuerpo incluyen las que son estructuralmente similares a las secuencias flanqueantes usadas por anticuerpos ilustrativos de la divulgación, por ejemplo, similares a las secuencias flanqueantes V_H 3-23 y/o las secuencias flanqueantes V_L λ3 o λ1-13 usadas por anticuerpos ilustrativos de la divulgación. Por ejemplo, las secuencias H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3, y las secuencias L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 de un anticuerpo ilustrativo pueden injertarse en regiones flanqueantes que tienen la secuencia idéntica a la hallada en el gen de inmunoglobulina de línea germinal del que deriva la secuencia flanqueante o las secuencias de CDR pueden injertarse en regiones flanqueantes que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de línea germinal.

45 En una realización particular, el derivado de anticuerpo es un anticuerpo quimérico que comprende una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo ilustrativo de la divulgación. En un ejemplo, una o más CDR de uno o más anticuerpos humanos ilustrativos se combinan con CDR de un anticuerpo de un animal no humano, tal como ratón o rata. En otro ejemplo, todas las CDR del anticuerpo quimérico derivan de uno o más anticuerpos ilustrativos. En algunas realizaciones particulares, el anticuerpo quimérico comprende una, dos o tres CDR de la región variable de cadena pesada o de la región variable de cadena ligera de un anticuerpo ilustrativo. Pueden generarse anticuerpos quiméricos usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

55 Otro tipo de modificación es mutar restos aminoácidos dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la cadena V_H y/o V_L. Puede realizarse mutagénesis dirigida o mutagénesis mediada por PCR para introducir la mutación o mutaciones y el efecto en unión de anticuerpo u otra propiedad funcional de interés, puede evaluarse en ensayos *in vitro* o *in vivo* conocidos en la técnica. Típicamente, se introducen sustituciones conservativas. Las mutaciones pueden ser adiciones y/o deleciones de aminoácidos. Además, típicamente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco restos dentro de una región CDR. En algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo comprende 1,

2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos en las H-CDR y/o en las CDR de cadena ligera. En otra realización, la sustitución de aminoácidos es cambiar una o más cisteínas en un anticuerpo a otro resto, tal como, sin limitación, alanina o serina. La cisteína puede ser una cisteína canónica o no canónica. En una realización, el derivado de anticuerpo tiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones H-CDR en relación con las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo ilustrativo.

También pueden realizarse modificaciones a los restos flanqueantes dentro de las regiones V_H y/o V_L . Típicamente, tales variantes flanqueantes se realizan para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo. Un enfoque es "retromutar" uno o más restos flanqueantes a la secuencia de línea germinal correspondiente. Un anticuerpo que ha experimentado mutación somática puede contener restos flanqueantes que difieren de la secuencia de línea germinal de la que deriva el anticuerpo. Tales restos pueden identificarse comparando las secuencias flanqueantes del anticuerpo con las secuencias de línea germinal de las que deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de región flanqueante a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas pueden "retromutarse" a la secuencia de línea germinal por, por ejemplo, mutagénesis dirigida o mutagénesis mediada por PCR. Varios de los anticuerpos ilustrativos de la presente divulgación experimentaron tales "retromutaciones" a ciertas secuencias de línea germinal, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 6.

Además, también pueden realizarse modificaciones dentro de la región Fc de un anticuerpo ilustrativo, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como semivida en suero, fijación de complemento, unión al receptor de Fc y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. En un ejemplo, la región bisagra de CH1 se modifica de modo que el número de restos de cisteína en la región bisagra se altera, por ejemplo, aumenta o reduce. Este enfoque se describe adicionalmente en la Patente de Estados Unidos N.º 5.677.425. El número de restos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada o para aumentar o reducir la estabilidad del anticuerpo. En otro caso, la región bisagra Fc de un anticuerpo se muta para reducir la semivida biológica del anticuerpo.

Además, un anticuerpo de la divulgación puede modificarse para alterar su patrón o sitio de glucosilación potencial. Ambos anticuerpos ilustrativos MOR-7480 y MOR-7483 y cualquier variante de línea germinal de los mismos y anticuerpos que comprenden las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de MOR-7480 y MOR-7483, comprenden un sitio de glucosilación ligado a N potencial (NYS) en la asparagina 59 en el dominio variable de cadena pesada. Las versiones IgG de estos anticuerpos comprenden adicionalmente un segundo sitio de glucosilación ligado a N en el dominio Fc de cadena pesada. Más específicamente, para la versión IgG2 de estos anticuerpos, el sitio de glucosilación ligado a N de Fc (NST) aparece en la asparagina 292 en el dominio CH2 de cadena pesada. Por lo tanto, cada cadena pesada puede comprender ocupación de glucano 0, 1 (en Fab o Fc) o 2 de modo que un anticuerpo que comprende dos cadenas ligeras y dos pesadas puede comprender cualquier combinación que varíe de ocupación de glucano 0 (es decir, sin glucosilación en ninguno de los cuatro sitios potenciales de glucosilación) a ocupación de glucano 4 (es decir, glucosilado en ambos sitios Fab y Fc en cada cadena). En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un derivado de un anticuerpo de 4-1BB de la divulgación que contiene al menos una mutación en una región variable de una cadena ligera o cadena pesada que cambia el patrón de glucosilación en la región variable. Un derivado de anticuerpo tal puede tener una afinidad aumentada y/o especificidad modificada para unión a un antígeno. Las mutaciones pueden añadir un nuevo sitio de glucosilación en la región V, cambiar la localización de uno o más sitios de glucosilación de la región V o retirar un sitio de glucosilación de región V preexistente. En una realización, la presente divulgación proporciona un derivado de un anticuerpo de 4-1BB que tiene un sitio de glucosilación potencial ligado a N en la asparagina 59 en la región variable de cadena pesada, en el que el sitio potencial de glucosilación ligado a N en una región variable de cadena pesada se elimina. En otra realización, la presente divulgación proporciona un derivado de un anticuerpo de 4-1BB que tiene un sitio de glucosilación potencial ligado a N en la asparagina 59 en la región variable de cadena pesada, en el que el sitio de glucosilación potencial ligado a N en ambas regiones variables de cadena pesada se elimina. Se conocen en la técnica procedimientos para alterar el patrón de glucosilación de un anticuerpo, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N.º 6.933.368.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un derivado de anticuerpo que comprende un anticuerpo de 4-1BB, o fragmento de unión a antígeno del mismo, como se ha descrito en el presente documento, ligado a una entidad molecular adicional. Los ejemplos de entidades moleculares adicionales incluyen agentes farmacéuticos, péptidos o proteínas, agente de detección o marcadores y anticuerpos.

En algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo comprende un anticuerpo de la divulgación ligado a un agente farmacéutico. Los ejemplos de agentes farmacéuticos incluyen agentes citotóxicos u otros agentes terapéuticos de cáncer e isótopos radiactivos. Los ejemplos específicos de agentes citotóxicos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil dacarbacina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, clorambucilo de tiotepa, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamin platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo,

dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Los ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero sin limitación, yodo¹³¹, indio¹¹¹, itrio⁹⁰ y lutecio¹⁷⁷. Se conocen en la técnica procedimientos para unir un anticuerpo a un agente farmacéutico, tales como usando diversas tecnologías de engarce. Los ejemplos de tipos de engarce incluyen hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y engarces que contienen péptidos. Para un análisis adicional de engarces y procedimientos para unir agentes terapéuticos a anticuerpos, véase también Saito y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215 (2003); Trail, y col., *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337 (2003); Payne, *Cancer Cell* 3:207-212 (2003); Allen, *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763 (2002); Pastan, I. and Kreitman, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091 (2002); Senter, P.D. y Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

En una realización particular, el derivado de anticuerpo es un multímero de anticuerpo de 4-1BB, que es una forma multimérica de un anticuerpo de 4-1BB, tal como dímeros, trímeros o multímeros de mayor orden de anticuerpo de anticuerpos monoméricos. Los monómeros individuales dentro de un multímero de anticuerpo pueden ser idénticos o diferentes. Además, los anticuerpos individuales dentro de un multímero pueden tener la misma o diferentes especificidades de unión. La multimerización de anticuerpos puede conseguirse a través de agregación natural de anticuerpos. Por ejemplo, cierto porcentaje de preparaciones de anticuerpo purificadas (por ejemplo, moléculas de IgG1 purificadas), forman espontáneamente agregados proteicos que contienen homodímeros de anticuerpo y otros multímeros de anticuerpo de mayor orden. Como alternativa, pueden formarse homodímeros de anticuerpo a través de técnicas de engarce químico conocidas en la materia, tales como a través del uso de agentes de entrecruzamiento. Los entrecruzadores adecuados incluyen los que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos claramente reactivos separados por un espaciador apropiado (tal como m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster, succinimidil 4-(maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato y N-succinimidil S-acetiltio-acetato) u homobifuncionales (tales como suberato de disuccinimidilo). Tales engarces están disponibles en el mercado de, por ejemplo, Pierce Chemical Company, Rockford, IL. También puede hacerse que los anticuerpos multimericen a través de técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia.

Los ejemplos de otros derivados de anticuerpo proporcionados por la presente divulgación incluyen anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, anticuerpos de dominio, nanocuerpos y unicuerpos. Un "anticuerpo de cadena sencilla" (scFv) consiste en una cadena polipeptídica sencilla que comprende un dominio V_L ligado a un dominio V_H en la que el dominio V_L y dominio V_H se emparejan para formar una molécula monovalente. Puede prepararse un anticuerpo de cadena sencilla de acuerdo con un procedimiento conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Bird y col., (1988) *Science* 242:423 426 y Huston y col., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879 5883). Un "diacuerpo" consiste en dos cadenas, comprendiendo cada cadena una región variable de cadena pesada conectada a una región variable de cadena ligera en la misma cadena polipeptídica conectada por un engarce peptídico corto, en las que las dos regiones de la misma cadena no se emparejan entre sí sino con dominios complementarios en la otra cadena para formar una molécula biespecífica. Se conocen en la técnica procedimientos para preparar diacuerpos (véase, por ejemplo, Holliger P. y col., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444 6448 y Poljak R. J. y col., (1994) *Structure* 2:1121 1123). Los anticuerpos de dominio (dAb) son unidades de unión funcionales pequeñas de anticuerpos, que corresponden a las regiones variables de las cadenas pesada o ligera de los anticuerpos. Los anticuerpos de dominio se expresan bien en sistemas celulares bacterianos, de levadura y de mamífero. Se conocen en la técnica detalles adicionales de anticuerpos de dominio y procedimientos de producción de los mismos (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N.º 6.291.158; 6.582.915; 6.593.081; 6.172.197; 6.696.245; Patentes europeas 0368684 y 0616640; documentos WO 05/035572, WO 04/101790, WO 04/081026, WO 04/058821, WO 04/003019 y WO03/002609). Los nanocuerpos derivan de las cadenas pesadas de un anticuerpo. Un nanocuerpo típicamente comprende un dominio variable sencillo y dos dominios constantes (CH2 y CH3) y conserva capacidad de unión a antígeno del anticuerpo original. Los nanocuerpos pueden prepararse por procedimientos conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 6.765.087, Patente de Estados Unidos N.º 6.838.254, documento WO 06/079372). Los unicuerpos consisten en una cadena ligera y una cadena pesada de un anticuerpo IgG4. Los unicuerpos pueden prepararse por la retirada de la región bisagra de anticuerpos IgG4. Pueden encontrarse detalles adicionales de unicuerpos y procedimientos para prepararlos en el documento WO 2007/059782.

C. ÁCIDOS NUCLEICOS, VECTORES, CÉLULAS HUÉSPED Y PROCEDIMIENTOS RECOMBINANTES PARA PRODUCIR ANTICUERPOS DE 4-1BB

Otro aspecto de la divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una molécula de unión proporcionada por la presente divulgación. La secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos puede ser cualquier parte de un anticuerpo, tal como una CDR, una secuencia que comprende una, dos o tres CDR, una región variable de una cadena pesada, región variable de una cadena ligera o puede ser una cadena pesada de longitud completa o una cadena ligera de longitud completa. Un ácido nucleico de la divulgación puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede o no contener secuencias intrónicas. Típicamente, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (1) secuencia de aminoácidos de una H-CDR3 o L-CDR3 de un anticuerpo ilustrativo; (2) una región

variable de una cadena pesada o región variable de una cadena ligera de un anticuerpo ilustrativo; o (3) una cadena pesada de longitud completa o cadena ligera de longitud completa de un anticuerpo ilustrativo.

En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 1 - 10, 15- 24, 29 - 38, 43, 44, 45, 46, 51, 52, 55-57, 60, 61, 64 y 65.

En otras realizaciones más, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11-14, 25-28, 39-42, 47-50, 53, 54, 58, 59, 62, 63, 66 y 67.

Pueden obtenerse ácidos nucleicos de la divulgación cualquier técnica de biología molecular adecuada. Para anticuerpos expresados por hibridomas, pueden obtenerse ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo realizado por el hibridoma mediante amplificación por PCR o técnicas de clonación de ADNc. Para anticuerpos obtenidos de una biblioteca génica de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de presentación de fagos), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede recuperarse de la biblioteca.

El ADN aislado que codifica la región V_H puede reconvertirse a un gen de cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica V_H con otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humanos se conocen en la técnica (véase por ejemplo, Kabat y col. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación de NIH N.º 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones por amplificación de PCR convencional. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferentemente es una región constante IgG1 o IgG4. La secuencia de región constante IgG1 puede ser cualquiera de los diversos alelos o alotipos que se sabe que aparecen entre diferentes individuos, tales como Gm(1), Gm(2), Gm(3) y Gm(17). Estos alotipos representan sustitución de aminoácidos de origen natural en las regiones constantes IgG1. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede unirse operativamente a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante de cadena pesada CH1.

El ADN aislado que codifica la región V_L puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como gen de cadena ligera de Fab) uniendo operativamente el ADN que codifica V_L con otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera humana se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat y col. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación de NIH N.º 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L se unen operativamente a otro fragmento que codifica un engarce flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄ - Ser)₃, de modo que las secuencias V_H y V_L pueden expresarse como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones V_L y V_H unidas por el engarce flexible (véase por ejemplo, Bird y col., *Science* 242:423-426 (1988); Huston y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); y McCafferty y col., *Nature* 348:552-554 (1990)).

La presente divulgación proporciona además un vector que comprende una molécula de ácido nucleico proporcionada para la presente divulgación. La molécula de ácido nucleico puede codificar una parte de una cadena ligera o cadena pesada (tal como una CDR o una región variable), una cadena ligera o pesada de longitud completa, polipéptido que comprende una parte o la longitud completa de una cadena pesada o ligera o una secuencia de aminoácidos de un derivado de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el vector es un vector de expresión útil para la expresión de una molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Para expresar una molécula de unión de la divulgación, se insertan ADN que codifican cadenas ligera y pesada de longitud completa o parcial en vectores de expresión de modo que las moléculas de ADN se unen operativamente a secuencias de control transcripcional y traduccional. En este contexto, la expresión "unido operativamente" significa que un gen de anticuerpo está ligado a un vector de modo que las secuencias de control traduccional y transcripcional dentro del vector cumplen su función pretendida de regular la transcripción y traducción de la molécula de ADN. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan para que sean compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión por cualquier procedimiento adecuado (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y vector o ligación de extremos romos si no hay sitios de restricción presentes). Las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo y subclase de anticuerpo insertándolas en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena ligera y constantes de cadena pesada del isotipo y subclase deseados de modo que el segmento V_H se une operativamente al segmento o segmentos C_H dentro del vector y el segmento V_K se une operativamente al segmento C_L dentro del vector. Adicionalmente, o como

alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena del anticuerpo de una célula huésped. El gen de cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector de modo que el péptido señal se une en fase con el extremo amino terminal del gen de cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión de la divulgación típicamente portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena de anticuerpo en una célula huésped. La expresión "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 cadena de anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Se apreciará por los expertos en la materia que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de tales factores como la selección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Los ejemplos de secuencias reguladoras para expresión en célula huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión proteica en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus de simio 40 (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP) y polioma). Como alternativa, pueden usarse secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de ubiquitina o promotor de β -globina. Además, elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema de promotor SR, que contiene secuencias del promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga del virus de leucemia de linfocitos T humanos de tipo 1 (Takebe, Y. y col. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

Además de los genes de cadena de anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que el vector se ha introducido (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N.º 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel y col.). 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 incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr con selección/amplificación por metotrexato) y el gen neo (para selección de G418).

Para expresión de las cadenas ligera y pesada el vector o vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula huésped por cualquier técnica adecuada. Las diversas formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia diversidad de técnicas habitualmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procarionta o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación por fosfato cálcico, transfección de DEAE-dextrano y similares. Aunque es posible expresar los anticuerpos de la divulgación en células huésped procariontas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas y típicamente células de huésped de mamífero, es más típica.

La presente divulgación proporciona adicionalmente una célula huésped que contiene una molécula de ácido nucleico proporcionada por la presente divulgación. La célula huésped puede ser virtualmente cualquier célula para la que están disponibles vectores de expresión. Puede ser, por ejemplo, una célula huésped eucariota superior, tal como una célula de mamífero, una célula huésped eucariota inferior, tal como una célula de levadura y puede ser una célula procarionta, tal como una célula bacteriana. La introducción de la construcción de ácido nucleico recombinante en la célula huésped puede efectuarse por transfección de fosfato cálcico, DEAE, transfección mediada por dextrano, electroporación o infección por fago.

Los huéspedes procariontas adecuados para transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*.

Las células huésped de mamífero para expresar una molécula de unión de la divulgación incluyen, por ejemplo, células de Ovario de Hámster Chino (CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220 (1980), usadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman y Sharp, *J. Mol. Biol.* 159:601-621 (1982), células de mieloma NS0, células COS y células Sp2. En particular, para su uso con células de mieloma NS0 o CHO, otro sistema de expresión es el sistema de expresión génica GS (glutamina sintetasa) desvelado en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338.841. Cuando se introducen vectores de expresión que codifican genes de anticuerpos en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que crecen las células huésped. Pueden recuperarse anticuerpos del medio de cultivo usando cualquier procedimiento de purificación de proteínas adecuado.

D. COMPOSICIONES

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una composición que contiene una molécula de unión

proporcionada por la divulgación. En un aspecto, la composición es una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden prepararse por procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

5 La expresión “composición farmacéutica” y “formulación farmacéutica” se refiere a composiciones que comprenden cualquiera de las moléculas de unión, cualquiera de los anticuerpos, cualquiera de las partes de unión a antígeno de los mismos o un derivado de los mismos, como se describe en el presente documento junto con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables según se requiera para preparar las formas farmacéuticas para el suministro eficaz de la molécula de unión.

10 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición que comprende un anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, proporcionado por la presente divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que dicho anticuerpo o una parte de unión a antígeno comprende un dominio variable que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR expuesta en SEQ ID NO: 30 y en la que dicha composición comprende no más de aproximadamente 11 %, 10 %, 8 %, 5 %, 3 % o 2 % de dicho anticuerpo, o parte de unión a antígeno, que se glucosila en la asparagina de dicha secuencia de aminoácidos en comparación con la cantidad total de anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, presente en dicha composición. En otra realización, la composición comprende al menos aproximadamente 2 % de dicho anticuerpo, o parte de unión a antígeno, que se glucosila en la asparagina de dicha secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 en comparación con la cantidad total de anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, presente en dicha composición.

20 Como se usa en el presente documento, el término “excipiente” significa las sustancias usadas para formular principios activos farmacéuticos en formulaciones farmacéuticas; en una realización preferida, un excipiente no reduce ni interfiere con el efecto terapéutico primario de los principios activos farmacéuticos. Preferentemente, un excipiente es terapéuticamente inerte. El término “excipiente” abarca vehículos, diluyentes, transportadores, solubilizadores, estabilizadores, agentes formadores de volumen, agentes de ajuste de pH ácido o básico y aglutinantes. Los excipientes también pueden ser las sustancias presentes en una formulación farmacéutica como resultado indirecto o no pretendido del procedimiento de fabricación. Preferentemente, los excipientes se aprueban o se consideran seguros para administración humana y animal, es decir, sustancias GRAS (generalmente consideradas seguras). Las sustancias GRAS se enumeran por la Administración de Fármacos y Alimentos en el Código de Regulaciones Federales (CFR) en 21 CFR 182 y 21 CFR 184.

30 La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquier sustancia inactiva que sea adecuada para su uso en una formulación para el suministro de una molécula de unión. Un vehículo puede ser un antiadherente, aglutinante, revestimiento, disgregante, carga o diluyente, conservante (tal como agente antioxidante, antibacteriano o antifúngico), edulcorante, agente retardante de la absorción, agente humectante, agente emulsionante, tampón y similares. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), dextrosa, aceites vegetales (tales como aceite de oliva), solución salina, tampón, solución salina tamponada y agentes isotónicos tales como azúcares, polialcoholes, sorbitol y cloruro sódico.

40 La expresión “agente tamponante” se refiere a un excipiente farmacéuticamente aceptable, que estabiliza el pH de una preparación farmacéutica. Los tampones adecuados se conocen bien en la técnica y pueden encontrarse en la bibliografía. Por ejemplo, pueden emplearse tampones de histidina, tampones de glicina, tampones tris o de acetato y/o los ácidos o bases libres respectivos de los mismos, así como mezclas de las diversas sales y/o ácidos y bases de los mismo. En una realización particular, los tampones son tampones de histidina, es decir tampones que tienen histidina, generalmente L-histidina como agente tamponante. Un tampón particular es tampón L-histidina/HCl, que comprende L-histidina, monoclóhidrato de L-histidina o mezclas de L-histidina y monoclóhidrato de L-histidina. Los tampones de L-histidina generalmente se usan a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml o de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 1 mg/ml. Los tampones de monoclóhidrato de L-histidina generalmente se usan a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml o de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml.

50 Independientemente del tampón usado, el pH puede ajustarse a un valor en el intervalo de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 7,0 o de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0, con una base o un ácido conocidos en la técnica, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido cítrico, hidróxido sódico e hidróxido potásico.

55 En un aspecto la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende: L-histidina de 0,1 a 1 mg/ml; monoclóhidrato de L-histidina de 1 a 5 mg/ml; Trehalosa deshidratada de 50 a 100 mg/ml; EDTA disódica dihidrato de 0,01 a 0,1 mg/ml; y polisorbato 80 de 0,05 a 1 mg/ml; a un pH en el intervalo de 4,0 a 7,0.

En una realización particular, la concentración de la molécula de unión comprendida en la composición de acuerdo con la invención está en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 22 mg/ml.

En otra realización particular, el agente tamponante comprendido en la composición de acuerdo con la invención es

un tampón de histidina, por ejemplo, un tampón de L-histidina/HCl, un tampón de acetato o un tampón de acetato sódico. En una realización particular, el agente tamponante es L-histidina/HCl.

En una realización en particular, el tampón está a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 50 mM o de 1 mM a aproximadamente 25 mM.

5 El pH de una composición de la invención puede seleccionarse de los siguientes intervalos: de 3 a 10 o de 4 a 9. En una realización particular, el agente tamponante proporciona un pH de 5,0 a 6,0 o $5,5 \pm 0,3$. Pueden ser necesarios ajustes de pH rutinarios dentro o fuera de estos intervalos para mejorar la solubilidad o estabilidad del polipéptido u otros componentes de la composición.

10 En una realización, la composición comprende un polisorbato, por ejemplo, polisorbato 20 o polisorbato 80. En una realización particular, el polisorbato 80 está a una concentración de 0,01 a 10 mg/ml, 0,5 a 5 mg/ml o 0,1 a 0,5 mg/ml.

15 En una realización, se selecciona al menos un estabilizador comprendido en la composición de acuerdo con la invención de los grupos de sales, por ejemplo, cloruro sódico, sacáridos, trehalosa dihidrato o sacarosa y aminoácidos, tales como clorhidrato de arginina. En una realización particular, al menos un estabilizador está a una concentración de 10 a 200 mg/ml, 20 a 150 mg/ml o 50 a 100 mg/ml.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "agente quelante" generalmente se refiere a un excipiente que puede formar al menos un enlace (por ejemplo, covalente, iónico o distinto) con un ion metálico. Un agente quelante es típicamente un ligando multidentado que puede usarse en composiciones líquidas seleccionadas como un estabilizador para formar complejo con especies, que podría promover la inestabilidad. Con frecuencia, los compuestos que pueden actuar como un agente quelante tendrán grupos funcionales ricos en electrones. Los grupos funcionales ricos en electrones adecuados incluyen grupos de ácido carboxílico, grupos hidroxilo y grupos amino. La disposición de estos grupos en ácidos aminopolicarboxílicos, ácidos hidroxipolicarboxílicos, ácidos hidroxiaminocarboxílicos y similares, da como resultado restos que tienen la capacidad de unirse a metales.

25 Sin embargo, la presente invención no pretende limitarse a agentes quelantes que potencian la estabilidad del anticuerpo principalmente por la capacidad del agente quelante para formar enlaces con un ion metálico. Por lo tanto, la presente invención no pretende limitarse por el mecanismo específico por el que el agente quelante estabiliza las composiciones de la presente invención y los excipientes denominados agentes quelantes en el presente documento pueden conseguir sus propiedades de potenciación de la estabilidad del anticuerpo a través de mecanismos que no están en absoluto relacionados con la capacidad del agente quelante para formar enlaces con un ion metálico.

30 Los agentes quelantes que son adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, ácidos aminopolicarboxílicos, ácidos hidroxiaminocarboxílicos, glicinas N-sustituidas, ácido 2-(2-amino-2-oxoetil) aminoetano sulfónico (BES), deferoxamina (DEF), ácido cítrico, niacinamida y desoxicolatos. Los ejemplos de ácidos aminopolicarboxílicos adecuados incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriamin pentaacético 5 (DTPA), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido N-2-acetamido-2-iminodiacético (ADA), bis(aminoetil)glicoléter, ácido N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido trans-diaminociclohexano tetraacético (DCTA), ácido glutámico y ácido aspártico. Los ejemplos de ácidos hidroxiaminocarboxílicos adecuados incluyen ácido N-hidroxietiliminodiacético (HIMDA), N,N-bis-hidroxietilglicina (bicina) y N-(trihidroximetilmetil) 10 glicina (tricina). Un ejemplo de una glicina N-sustituida adecuada es glicilglicina. Un ejemplo de un desoxicolato es desoxicolato sódico.

40 Los agentes quelantes usados en la invención pueden estar presentes, cuando sea posible, como la forma de base libre o ácido libre del compuesto (por ejemplo, denominado de forma intercambiable en el presente documento "EDTA" o "edetato") o como una forma de sal correspondiente (por ejemplo, la sal de adición de ácidos o sal de adición de bases correspondiente, tal como edetato disódico). Las sales de adición de ácidos adecuadas, por ejemplo, incluyen sales de metales alcalinos (por ejemplo, sales potásicas o sódicas), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio) y pueden prepararse sales usando otros iones metálicos unidos débilmente. Como se conoce en la técnica, la naturaleza de la sal y el número de cargas a neutralizar dependerá del número de grupos carboxilo presentes y el pH al que se proporciona el agente quelante estabilizador. Como también se conoce en la técnica, los agentes quelantes tienen diversas fuerzas con las que se unen a iones diana particulares. Como ilustración adicional, las sales adecuadas de EDTA incluyen edetato dipotásico, edetato disódico, edetato cálcico 45 disódico, edetato sódico, edetato trisódico y edetato potásico; y una sal adecuada de deferoxamina (DEF) es mesilato de deferoxamina (DFM).

55 Los agentes quelantes usados en la invención pueden estar presentes como una forma anhídrida, solvatada o hidratada del compuesto o sal correspondiente. Cuando el agente quelante está en una forma solvatada o hidratada, puede estar presente en diversos estados de solvatación o hidratación (incluyendo, por ejemplo, formas anhídridas, hidratadas, dihidratadas y trihidratadas). Como ilustración adicional, un hidrato adecuado de EDTA es dihidrato de EDTA disódico. En una realización, el dihidrato de EDTA disódico está a una concentración de 0,001 a 5 mg/ml, de 0,01 a 2 mg/ml y de 0,02 a 0,5 mg/ml. En otra realización, el agente quelante puede reducir o prevenir la agregación de los anticuerpos en las composiciones descritas en el presente documento. Tales agentes quelantes pueden

reducir o evitar la degradación de un anticuerpo que se formula sin la protección de un agente quelante.

Las composiciones farmacéuticas generalmente pueden adaptarse a la vía de administración pretendida específica. Existen múltiples técnicas de administrar un compuesto en la materia incluyendo, pero sin limitación, administración oral, aerosol, parenteral y tópica. Las composiciones pueden estar en cualquier forma adecuada, tal como formas farmacéuticas líquidas, semisólidas y sólidas. Los ejemplos de formas farmacéuticas líquidas incluyen solución (por ejemplo, soluciones inyectables e infundibles), microemulsión, liposoma, dispersión o suspensión. Los ejemplos de formas farmacéuticas sólidas incluyen comprimido, píldora, cápsula, microcápsula y polvo. Una forma particular de la composición adecuada para suministrar una molécula de unión es un líquido estéril, tal como una solución, suspensión o dispersión para inyección o infusión. Pueden prepararse soluciones estériles incorporando el anticuerpo en la cantidad requerida en un vehículo apropiado, seguido de microfiltración de esterilización. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el anticuerpo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y otros vehículos. En el caso de polvos estériles para preparación de líquido estéril, los procedimientos de preparación incluyen secado en vacío y secado en congelación (liofilización) para producir un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada estéril del mismo. Las diversas formas farmacéuticas de las composiciones pueden prepararse por técnicas convencionales conocidas en la materia.

La cantidad relativa de una molécula de unión incluida en la composición variará dependiendo de varios factores, tales como la molécula de unión específica y vehículos usados, forma farmacéutica y características farmacodinámicas y de liberación deseadas. En una realización, la composición comprende una molécula de unión en la que dicha concentración de molécula de unión está entre 1 y 100 mg/ml, entre 5 y 50 mg/ml o entre 10 y 22 mg/ml. La cantidad de una molécula de unión en una forma farmacéutica sencilla generalmente será la cantidad que produce un efecto terapéutico, pero puede ser también una cantidad menor. Generalmente, esta cantidad variará de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente 99 por ciento, de aproximadamente 0,1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento o de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento en relación con el peso total de la forma farmacéutica.

Además de la molécula de unión, pueden incluirse uno o más agentes terapéuticos adicionales en la composición. Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales se describen posteriormente en el presente documento. La cantidad adecuada del agente terapéutico adicional a incluir en la composición puede seleccionarse fácilmente por un experto en la materia y variará dependiendo de varios factores, tales como el agente particular y vehículo usados, forma farmacéutica y características farmacodinámicas y de liberación deseadas. La cantidad del agente terapéutico adicional incluido en una forma farmacéutica sencilla será generalmente la cantidad del agente que produce un efecto terapéutico, pero también puede ser una cantidad menor.

E. USO DE LAS MOLÉCULAS DE UNIÓN Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Las moléculas de unión y composiciones farmacéuticas proporcionadas por la presente divulgación son útiles para fines terapéuticos, diagnósticos u otros, tales como potenciar una respuesta inmune, tratar cáncer, potenciar la eficacia de otra terapia de cáncer, potenciar la eficacia de vacunas o tratar enfermedades autoinmunes. Por lo tanto, en otros aspectos, la presente divulgación proporciona procedimientos para usar las moléculas de unión o composiciones farmacéuticas. En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar un trastorno en un mamífero, que comprende administrar al mamífero que necesite tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión proporcionada por la divulgación. La molécula de unión puede ser un agonista o antagonista de 4-1BB. En algunas realizaciones, la molécula de unión es un agonista de 4-1BB. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano.

En algunas realizaciones, el trastorno es un cáncer. Una diversidad de cánceres en los que está implicado 4-1BB, malignos o benignos y primarios o secundarios, puede tratarse o prevenirse con un procedimiento proporcionado por la divulgación. Los ejemplos de tales cánceres incluyen cánceres de pulmón tales como carcinoma broncogénico (por ejemplo, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células pequeñas, carcinoma de células grandes y adenocarcinoma), carcinoma de células alveolares, adenoma bronquial, hamartoma condromatoso (no canceroso) y sarcoma (canceroso); cáncer de corazón tal como mixoma, fibromas y rabiomas; cánceres de hueso tales como osteocondromas, condromas, condroblastomas, fibromas condromixoides, osteomas osteoides, tumores de células gigantes, condrosarcoma, mieloma múltiple, osteosarcoma, fibrosarcomas, histiocitomas fibrosos malignos, tumor de Ewing (sarcoma de Ewing) y sarcoma de células del retículo; cáncer cerebral tal como gliomas (por ejemplo, glioblastoma multiforme), astrocitomas anaplásicos, astrocitomas, oligodendrogliomas, meduloblastomas, cordoma, schwannomas, ependimomas, meningiomas, adenoma de la hipófisis, pinealoma, osteomas, hemangioblastomas, craneofaringiomas, cordomas, germinomas, teratomas, quistes dermoides y angiomas; cánceres en el sistema digestivo tales como leiomioma, carcinoma epidermoide, adenocarcinoma, leiomiomas, adenocarcinomas de estómago, lipomas intestinales, neurofibromas intestinales, fibromas intestinales, pólipos en el intestino grueso y cánceres colorrectales; cánceres de hígado tales como adenomas hepatocelulares, hemangioma, carcinoma hepatocelular, carcinoma fibrolamelar, colangiocarcinoma, hepatoblastoma y angiosarcoma; cánceres de riñón tales como adenocarcinoma de riñón, carcinoma de células renales, hipernefoma y carcinoma de células transicionales de la pelvis renal; cánceres de vejiga; cánceres hematológicos tales como leucemia linfocítica aguda (linfoblástica), leucemia mieloide (mielocítica, mielógena, mieloblástica, mielomonocítica) aguda, leucemia linfocítica crónica (por

ejemplo, síndrome de Sezary y tricoleucemia), leucemia mielocítica (mieloide, mielógena, granulocítica) crónica, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfoma de linfocitos B, micosis fungoide y trastornos mieloproliferativos (incluyendo trastornos mieloproliferativos tales como policitemia vera, mielofibrosis, trombocitemia y leucemia mielocítica crónica); cánceres de la piel tales como carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, melanoma, sarcoma de Kaposi y enfermedad de Paget; cánceres de cabeza y cuello; cánceres relacionados con el ojo tales como retinoblastoma y melanocarcinoma intraocular; cánceres del sistema reproductor masculino tales como hiperplasia prostática benigna, cáncer de próstata y cánceres testiculares (por ejemplo, seminoma, teratoma, carcinoma embrionario y coriocarcinoma); cáncer de mama; cánceres del sistema reproductor femenino tales como cáncer uterino (carcinoma endometrial), cáncer cervical (carcinoma cervical), cáncer de los ovarios (carcinoma ovárico), carcinoma vulvar, carcinoma vaginal, cáncer de las trompas de Falopio y mola hidatiforme; cáncer de tiroides (incluyendo cáncer papilar, folicular, anaplásico o medular); feocromocitomas (glándula adrenal); crecimientos no cancerosos de las glándulas paratiroides; cánceres pancreáticos; y cánceres hematológicos tales como leucemias, mielomas, linfomas no de Hodgkin y linfomas de Hodgkin.

En algunas otras realizaciones, el trastorno es una enfermedad autoinmune. Los ejemplos de enfermedades autoinmunes que pueden tratarse con las moléculas de unión incluyen encefalomiелitis autoinmune, lupus eritematoso y artritis reumatoide. La molécula de unión también puede usarse para tratar inflamación (tal como asma alérgica) y enfermedad de injerto contra huésped crónica.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para potenciar una respuesta inmune en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión proporcionada por la divulgación. En algunas realizaciones, la molécula de unión es un anticuerpo de 4-1BB o fragmento de unión a antígeno del mismo y el mamífero es un ser humano. En una realización adicional, la molécula de unión es un anticuerpo agonista de 4-1BB o un fragmento de unión a antígeno del mismo. La expresión "potenciar la respuesta inmune" o sus variaciones gramaticales, significa estimular, inducir, aumentar, mejorar o incrementar cualquier respuesta del sistema inmune de un mamífero. La respuesta inmune puede ser una respuesta celular (es decir, mediada por células, tal como mediada por linfocitos T citotóxicos) o una respuesta humoral (es decir respuesta mediada por anticuerpos) y puede ser una respuesta inmune primaria o secundaria. Los ejemplos de potenciación de respuesta inmune incluyen actividad de linfocitos T auxiliares CD4+ y generación de linfocitos T citotóxicos aumentadas. La potenciación de respuesta inmune puede evaluarse usando varias medidas *in vitro* o *in vivo* conocidas por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, ensayos de linfocitos T citotóxicos, liberación de citocinas (por ejemplo producción de IL-2), regresión de tumores, supervivencia de animales que portan tumores, producción de anticuerpos, proliferación de células inmunes, expresión de marcadores de superficie celular y citotoxicidad. Típicamente, los procedimientos de la divulgación potencian la respuesta inmune de un mamífero en comparación con la respuesta inmune de un mamífero no tratado o un mamífero no tratado usando los procedimientos reivindicados. En una realización, la molécula de unión se usa para potenciar la respuesta inmune de un ser humano a un patógeno microbiano (tal como un virus). En otra realización, la molécula de unión se usa para potenciar la respuesta inmune de un ser humano a una vacuna. La molécula de unión puede ser un agonista o antagonista de 4-1BB. En algunas realizaciones, la molécula de unión es un agonista de 4-1BB. En una realización, el procedimiento potencia una respuesta inmune celular, particularmente una respuesta de linfocitos T citotóxicos. En otra realización, la respuesta inmune celular es una respuesta de linfocitos T auxiliares. En otra realización más, la respuesta inmune es una producción de citocinas, particularmente producción de IL-2. La molécula de unión puede usarse para potenciar la respuesta inmune de un ser humano a un patógeno microbiano (tal como un virus) o para una vacuna. La molécula de unión puede ser un agonista o antagonista de 4-1BB. En algunas realizaciones, la molécula de unión es un agonista de 4-1BB.

En la práctica de los procedimientos terapéuticos, las moléculas de unión pueden administrarse solas como monoterapia o administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos o terapias adicionales. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente divulgación proporciona una terapia de combinación, que comprende una molécula de unión en combinación con una o más terapias o agentes terapéuticos adicionales para administración separada, secuencial o simultánea. La expresión "terapia adicional" se refiere a una terapia que no emplea una molécula de unión proporcionada por la divulgación como un agente terapéutico. La expresión "agente terapéutico adicional" se refiere a cualquier agente terapéutico distinto de una molécula de unión proporcionado por la divulgación. En un aspecto particular, la presente divulgación proporciona una terapia de combinación para tratar cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión proporcionada por la divulgación en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En una realización adicional, el mamífero es un ser humano.

Puede usarse una amplia diversidad de agentes terapéuticos de cáncer en combinación con una molécula de unión proporcionada por la presente divulgación. Un experto en la materia reconocerá la presencia y desarrollo de otras terapias de cáncer que pueden usarse en combinación con los procedimientos y moléculas de unión de la presente divulgación y no estará restringido a las formas de terapia expuestas en el presente documento. Los ejemplos de categorías de agentes terapéuticos adicionales que pueden usarse en la terapia de combinación para tratar cáncer incluyen (1) agentes quimioterapéuticos, (2) agentes inmunoterapéuticos y (3) agentes terapéuticos hormonales.

La expresión "agente quimioterapéutico" se refiere a una sustancia química o biológica que puede causar muerte de células cancerosas o interferir con el crecimiento, división, reparación y/o función de células cancerosas. Los

ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen los que se desvelan en los documentos WO 2006/088639, WO 2006/129163 y US 20060153808. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos particulares incluyen: (1) agentes alquilantes, tales como clorambucilo (LEUKERAN), ciclofosfamida (CYTOXAN), ifosfamida (IFEX), clorhidrato de mecloretamina (MUSTARGEN), tiotepa (THIOPLEX), estreptoizotocina (ZANOSAR), carmustina (BICNU, OBLEA GLIADEL), lomustina (CEENU) y dacarbacina (DTIC-DOME); (2) alcaloides o alcaloides vegetales de la vinca, incluyendo antibióticos citotóxicos, tales como doxorubicina (ADRIAMYCIN), epirubicina (ELLENC, PHARMORUBICIN), daunorubicina (CERUBIDINE, DAUNOXOME), nemorubicina, idarrubicina (IDAMYCIN PFS, ZAVEDOS), mitoxantrona (DHAD, NOVANTRONE), dactinomicina (actinomicina D, COSMEGEN), plicamicina (MITHRACIN), mitomicina (MUTAMYCIN) y bleomicina (BLENOXANE), tartrato de vinorelbina (NAVELBINE), vinblastina (VELBAN), vincristina (ONCOVIN) y vindesina (ELDISINE); (3) antimetabolitos, tales como capecitabina (XELODA), citarabina (CYTOSAR-U), fludarabina (FLUDARA), gemcitabina (GEMZAR), hidroxiurea (HYDRA), metotrexato (FOLEX, MEXATE, TREXALL), nelarabina (ARRANON), trimetrexato (NEUTREXIN) y pemetrexed (ALIMTA); (4) antagonistas de pirimidina, tales como 5-fluorouracilo (5-FU); capecitabina (XELODA), raltitrexed (TOMUDEX), tegafururacilo (UFTORAL) y gemcitabina (GEMZAR); (5) taxanos, tales como docetaxel (TAXOTER), paclitaxel (TAXOL); (6) fármacos de platino, tales como cisplatino (PLATINOL), carboplatino (PARAPLATIN) y oxaliplatino (ELOXATIN); (7) inhibidores de topoisomerasa, tales como irinotecan (CAMPOTOSAR), topotecan (HYCANTIN), etopósido (ETOPOPHOS, VEPESSID, TOPOSAR) y tenipósido (VUMON); (8) epipodofilotoxinas (derivados de podofilotoxinas), tales como etopósido (ETOPOPHOS, VEPESSID, TOPOSAR); (9) derivados de ácido fólico, tales como leucovorina (WELLCOVORIN); (10) nitrosoureas, tales como carmustina (BICNU), lomustina (CeeNU); (11) inhibidores de tirosina quinasa receptora, incluyendo receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), receptor de insulina, receptor de factor de crecimiento de tipo insulina (IGFR), receptor de factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR) y receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) tal como gefitinib (IRESSA), erlotinib (TARCEVA), bortezumib (VELCADE), mesilato de imatinib (GLEEVEC), genefitinib, lapatinib, sorafenib, talidomida, sunitinib (SUTENT), axitinib, rituximab (RITUXAN, MABTHERA), trastuzumab (HERCEPTIN), cetuximab (ERBITUX), bevacizumab (AVASTIN) y ranibizumab (LUCENTIS), lym-1 (ONCOLYM), anticuerpos para el receptor de factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1R) que se desvelan en el documento WO 2002/053596; (12) inhibidores de angiogénesis tales como tales como bevacizumab (AVASTIN), suramina (GERMANIN), angiostatina, SU5416, talidomida e inhibidores de metaloproteínasa de matriz (tales como batimastat y marimastat) y los que se desvelan en el documento WO 2002055106; y (13) inhibidores de proteasoma, tales como bortezumib (VELCADE).

La expresión "agentes inmunoterapéuticos" se refiere a una sustancia química o biológica que puede potenciar una respuesta inmune de un mamífero. Los ejemplos de agentes inmunoterapéuticos incluyen: bacilo Calmette-Guerin (BCG); citocinas tales como interferones; vacunas tales como inmunoterapia personalizada MyVax, OnyVax-P, Oncofago, GRNVAC1, FavId, Provenge, GVAX, Lovaxina C, BiovaxID, GMXX y NeuVax; y anticuerpos tales como alemtuzumab (CAMPATH), bevacizumab (AVASTIN), cetuximab (ERBITUX), gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG), ibritumomab tiuxetan (ZEVALIN), panitumumab (VECTIBIX), rituximab (RITUXAN, MABTHERA), trastuzumab (HERCEPTIN), tositumomab (BEXXAR), ipilimumab (YERVOY) tremelimumab, CAT-3888, anticuerpos agonistas de receptor OX40 (tales como los desvelados en el documento WO 2009/079335), anticuerpos agonistas para el receptor CD40 (tales como los desvelados en el documento WO 2003/040170) y agonistas de TLR-9 (tales como los desvelados en los documentos WO 2003/015711, WO 2004/016805 y WO 2009/022215).

La expresión "agente terapéutico hormonal" se refiere a una sustancia química o biológica que inhibe o elimina la producción de una hormona o inhibe o contrarresta el efecto de una hormona en el crecimiento y/o supervivencia de células cancerosas. Los ejemplos de tales agentes adecuados para los procedimientos del presente documento incluyen los que se desvelan en el documento US 20070117809. Los ejemplos de agentes terapéuticos hormonales particulares incluyen tamoxifeno (NOLVADEX), toremifeno (Fareston), fulvestrant (FASLODEX), anastrozol (ARIMIDEX), exemestano (AROMASIN), letrozol (FEMARA), acetato de megestrol (MEGACE), goserelina (ZOLADEX) y leuprolide (LUPRON). Las moléculas de unión de la presente divulgación también pueden usarse en combinación con terapias hormonales no farmacológicas tales como (1) procedimientos quirúrgicos que retiran todo o parte de los órganos o glándulas que participan en la producción de la hormona, tales como los ovarios, los testículos, la glándula adrenal y la glándula hipófisis y (2) tratamiento con radiación, en el que los órganos o glándulas del paciente se someten a radiación en una cantidad suficiente para inhibir o eliminar la producción de la hormona diana.

La terapia de combinación para tratar cáncer también abarca la combinación de una molécula de unión con cirugía para retirar un tumor. La molécula de unión puede administrarse al mamífero antes, durante o después de la cirugía.

La terapia de combinación para tratar cáncer también abarca combinación de una molécula de unión con radioterapia, tal como radioterapia ionizante (electromagnética) (por ejemplo, rayos X o rayos gamma) y radioterapia de rayos de partículas (por ejemplo, radiación de alta energía lineal). La fuente de radiación puede ser externa o interna al mamífero. La molécula de unión puede administrarse al mamífero antes, durante o después de la radioterapia.

Las moléculas de unión y composiciones proporcionadas por la presente divulgación pueden administrarse mediante cualquier vía entérica a o vía parenteral de administración adecuada. El término "vía entérica" de administración se refiere a la administración mediante cualquier parte del tracto gastrointestinal. Los ejemplos de vías entéricas

incluyen vía oral, mucosa, bucal y rectal o vía intragástrica. “Vía parenteral” de administración se refiere a una vía de administración distinta de vía entérica. Los ejemplos de vías parenterales de administración incluyen administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intratumoral, intravesicular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, transtraqueal, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal, subcutánea o tópica. Los anticuerpos y composiciones de la divulgación pueden administrarse usando cualquier procedimiento adecuado, tal como por ingestión oral, tubo nasogástrico, tubo de gastrostomía, inyección, infusión, bomba de infusión implantable y bomba osmótica. La vía y procedimiento adecuado de administración puede variar dependiendo de varios factores tales como el anticuerpo específico usado, la tasa de absorción deseada, formulación o forma farmacéutica específica usada, tipo o gravedad del trastorno a tratar, el sitio específico de acción y las condiciones del paciente y pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la materia.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” de una molécula de unión se refiere a una cantidad que es eficaz para un fin terapéutico pretendido. Por ejemplo, en el contexto de potenciar una respuesta inmune, una “cantidad terapéuticamente eficaz” es cualquier cantidad que sea eficaz para estimular, inducir, aumentar, mejorar o incrementar cualquier respuesta del sistema inmune de un mamífero. En el contexto de tratar una enfermedad, una “cantidad terapéuticamente eficaz” es cualquier cantidad que es suficiente para provocar cualquier efecto deseable o beneficioso en el mamífero a tratar. Específicamente, en el tratamiento de cáncer, los ejemplos de efectos beneficiosos o deseables incluyen inhibición del crecimiento adicional o proliferación de células cancerosas, muerte de células cancerosas, inhibición de reparación de cáncer, reducción de dolor asociado con el cáncer o mejora de la supervivencia del mamífero. La cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de 4-1BB habitualmente varía de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 500 mg/kg y más habitualmente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg/kg, del peso corporal del mamífero. Por ejemplo, la cantidad puede ser de aproximadamente 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 50 mg/kg o 100 mg/kg de peso corporal del mamífero. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de 4-1BB está en el intervalo de aproximadamente 0,01 - 30 mg/kg del peso corporal del mamífero. En algunas realizaciones adicionales, la cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de 4-1BB está en el intervalo de aproximadamente 0,05 - 15 mg/kg del peso corporal del mamífero. El nivel de dosificación preciso a administrar puede determinarse fácilmente por un experto en la materia y dependerá de varios factores, tales como el tipo y gravedad del trastorno a tratar, la molécula de unión particular empleada, la vía de administración, el momento de administración, la duración del tratamiento, la terapia adicional particular empleada, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico anterior del paciente a tratar y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Una molécula de unión o composición se administra habitualmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis sencillas pueden ser, por ejemplo, semanales, mensuales, cada tres meses o anuales. Un régimen de tratamiento ejemplar implica 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 tres meses o una vez cada tres a seis meses. Los regímenes de dosificación típicos para un anticuerpo de 4-1BB incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa, usando uno de los siguientes programas de dosificación: (i) cada cuatro semanas durante seis dosificaciones, después cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

La presente divulgación se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos que no deberían interpretarse como limitantes adicionales.

Ejemplos

Ejemplo 1: generación de fragmentos fab que se unen a 4-1bb

Ciertos anticuerpos proporcionados por la presente invención se generaron originalmente a partir de Fab que se unen a 4-1BB humano. Los Fab se seleccionaron de una biblioteca de presentación de fagos, la biblioteca de fagémidos MorphoSys HuCAL GOLD[®], después selección alterna en FC de 4-1BB y células que expresan 4-1BB humano. Estos Fab incluyen los que se designan como “Fab-6032,” “Fab 7361,” “Fab-7480,” y “Fab-7483.” Los anticuerpos de 4-1BB MOR-6032, MOR 7361, MOR-7480 y MOR-7483 desvelados en la presente solicitud se generaron a partir de “Fab-6032,” “Fab-7361,” “Fab-7480,” and “Fab-7483, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada de un Fab dado son idénticas a la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada, respectivamente, de un anticuerpo ilustrativo cuya designación comparte el mismo número con la designación del Fab. Por ejemplo, Fab-7840 y el anticuerpo MOR-7480 tienen secuencias de aminoácidos idénticas para su región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada, respectivamente.

La biblioteca de fagémidos se basa en el concepto de HuCAL[®] (Knappik y col., 2000, J. Mol. Biol. 296(1):57-86) y emplea la tecnología de CysDisplay[™] para presentar el Fab en la superficie de fago (Löhning, documento WO 01/05950). HuCAL GOLD[®] proporciona la opción de realizar selecciones con seis sub-bibliotecas sencillas comprendiendo cada una un gen maestro de VH (VH1, VH2, VH3, VH4, VH5, VH6) combinado con los siete genes maestros de VL o realizando selecciones usando grupos de fagos combinados. Los fagos para el primer ciclo de selecciones se prepararon por Hyperphage (M13KO7ΔpIII, obtenido de Progen, Heidelberg, Alemania). HuCAL

GOLD® se describe en detalle en Christine Rothe, y col, J. Mol. Biol. (2008) 376, 1182-1200.

Se realizó selección en fase sólida usando 4-1BB-Fc humano recombinante (R&D Systems, Cat. N.º 838-4B; Minneapolis, MN).

Ejemplo 2. caracterizaciones de fab

- 5 Las caracterizaciones de los cuatro Fab descritos en el ejemplo 1 se determinaron en los ensayos descritos posteriormente usando el formato de Fab monovalente que comprende un Fab que tiene un marcador Flag/His.

2A. Afinidad determinada con procedimiento de valoración en equilibrio de solución (SET)

- 10 La afinidad (expresada como K_D) de los cuatro Fab se determinó usando el procedimiento de SET usando una instrumentación de Meso Scale Discovery (“MSD”). Se usaron fracciones monoméricas de proteína de anticuerpo (al menos 90 % de contenido monomérico, analizado por SEC analítico; Superdex75 (Amersham Pharmacia) para Fab o Tosoh G3000SWXL (Tosoh Bioscience) para IgG, respectivamente).

La determinación de afinidad en solución se realizó básicamente como se describe en la bibliografía (Friguet y col. 1985). Para mejorar la sensibilidad y precisión del procedimiento de SET, se transfirió de ELISA clásica a tecnología basada en ECL (Haenel y col. 2005).

- 15 Se marcaron anticuerpos específicos anti-fragmento (Fab)₂ humano de cabra 1 mg/ml (Dianova) con MSD Sulfo-Tag™ NHS-Ester (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 20 Los experimentos se llevaron a cabo en placas de microtitulación de polipropileno y PBS pH 7,4 con BSA 0,5 % y Tween 20 0,02 % como tampón de ensayo. Se diluyó 4-1BB humano no marcado en una serie 2ⁿ, comenzando con una concentración al menos 10 veces superior a la K_D esperada. Se usaron pocillos sin antígeno para determinar valores de $B_{máx}$; se usaron pocillos con tampón de ensayo para determinar el fondo. Después de la adición de, por ejemplo, Fab 30 pM (concentración final de 60 µl de volumen final), la mezcla se incubó durante una noche a temperatura ambiente. La concentración de Fab aplicada fue similar a o por debajo de la K_D esperada.

- 25 Se revistieron placas de MSD convencionales con 4-1BB humano 0,05 µg/ml en PBS (30 µl/pocillo), se incubaron durante una noche y se bloquearon con BSA 3 % en PBS durante una hora. Después de lavar la placa con tampón de ensayo, las muestras equilibradas se transfirieron a esas placas (30 µl por pocillo) y se incubaron durante 20 minutos. Después de lavar, se añadieron 30 µl/pocillo del anticuerpo de detección marcado con MSD Sulfo-tag ((Fab)₂ de cabra anti-humano) en una dilución final de 1:1500 a la placa de MSD y se incubó durante 30 minutos en un agitador de Eppendorf (700 rpm).

- 30 Después de lavar la placa y añadir Tampón de Lectura T de MSD 30 µl/pocillo con tensioactivo, se detectaron señales de electroquimioluminiscencia usando un Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, Estados Unidos).

- 35 Los datos se evaluaron con software XLfit (IDBS) aplicando modelos de ajuste adaptados. Para determinación de K_D de moléculas Fab se usó el siguiente modelo de ajuste (Haenel y col., 2005) y se modificó de acuerdo con Abraham y col. (1996, J. Molec. Recog. 9(5-6):456-461):

$$y = B_{máx} - \left(\frac{B_{máx}}{2[Fab]_t} \left([Fab]_t + x + K_D - \sqrt{([Fab]_t + x + K_D)^2 - 4x[Fab]_t} \right) \right)$$

- 40 [Fab]_t: Concentración de Fab total aplicado
 x: Concentración de antígeno soluble total aplicado (sitios de unión)
 B_{máx}: Señal máxima de Fab sin antígeno
 K_D: Afinidad

Los resultados se presentan en la Tabla 3.

2B. Determinación de K_D de Biacore en Antígeno Revestido Directamente

- 45 Para determinación de K_D , se usaron fracciones de Fab monomérico (al menos 90 % de contenido monomérico, analizado por SEC analítico; Amersham Pharmacia) como analito. Se analizó la unión a antígeno inmovilizado usando un instrumento BIAcore3000 (Biacore, Suecia).

Las constantes de velocidad cinética k_{on} y k_{off} se determinaron con diluciones en serie de la unión respectiva de Fab al antígeno inmovilizado de forma covalente CD137/4-1BB humano usando el instrumento Biacore 3000 (Biacore, Suecia). Para inmovilización de antígeno covalente se usó química de acoplamiento de amina EDC-NHS convencional. Se realizaron mediciones cinéticas en HBS-EP (HEPES 10 mM; pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 3 mM;

Tween 20 0,005 %) a un caudal de 20 μ l/minuto usando concentraciones de Fab que variaban de aproximadamente 16 a 500 nM. El tiempo de inyección para cada concentración fue de 1 minuto, seguido de al menos 3 minutos de fase de disociación. Para regeneración, se usaron una o más inyecciones de 5 μ l de glicina/HCl pH 2.

5 Para estimación de K_D de moléculas IgG completas, se inyectaron IgG como muestras en una microplaca sensora F1 con una baja densidad de 4-1BB humano inmovilizado de forma covalente (aproximadamente 130 UR) usando una dilución en serie 2ⁿ con concentraciones que variaban de 16 a 500 nM. Se evaluaron sensogramas usando un modelo de ajuste bivalente comparado cualitativamente para clasificar los valores de K_D correspondientes.

Todos los sensogramas se ajustaron usando software de evaluación BIA 3.1 (Biacore). Los resultados se presentan en la Tabla 3.

10 2C. Unión de Fab en Ensayo de ELISA

La unión de los cuatro Fab se determinó usando técnicas de ELISA convencionales en 4-1BB/Fc humanos revestidos directamente. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

2D. Unión de Fab en Ensayo de FACS

15 La unión de los cuatro Fab se determinó usando técnicas de ensayo de FACS convencional en células HEK293 transfectadas de forma estable y que expresaban 4-1BB humano así como células de control negativo 300.19 (línea de linfocitos B murinos). Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Propiedades de Unión de Fab

| Fab | Afinidad de BIAcore K_D [nM] | Afinidad de SET K_D [pM] | Ensayo de ELISA CE50 [nM] | Ensayo de FACS CE50 [nM] |
|----------|-----------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Fab-6032 | 66 | No medida | 1,0 | 270 |
| Fab-7361 | 118 | No medida | 0,6 | 105 |
| Fab-7480 | 0,5 | 46 | 0,7 | 0,9 |
| Fab-7483 | 0,7 | 43 | 0,6 | 8,9 |

Ejemplo 3: caracterización de IgG

20 Se seleccionaron varios Fab obtenidos de la selección como se ha descrito en el presente documento, incluyendo Fab-6032, Fab-7361, Fab-7480 y Fab-7483 para conversión en anticuerpos de longitud completa en formatos IgG1 e IgG4 para caracterizaciones adicionales como se describe en este ejemplo. Los cuatro anticuerpos ilustrativos identificados en este ejemplo, es decir, MOR-6032, MOR-7361, MOR-7480 y MOR-7483, se convirtieron a partir de Fab-6032, Fab-7361, Fab-7480 y Fab-7483, respectivamente. Los anticuerpos en formato IgG se expresaron y purificaron y después se caracterizaron en ELISA, FACS y ensayos de gen indicador de luciferasa.

3A. Conversión a IgG

Para expresar IgG de longitud completa, se subclonaron fragmentos de dominio variable de cadenas pesada (VH) y ligera (VL) de vectores de expresión de Fab en vectores pMorph[®]_hIgG apropiados para IgG1 humana e IgG4 humana.

30 3B. Expresión Transitoria y Purificación de IgG Humana

35 Se realizó expresión transitoria de IgG humana de longitud completa en células HKB11, que se transfectaron con vectores de expresión de cadena ligera y pesada IgG a una relación 1:1. Se recogió el sobrenadante de cultivo celular después de transfección y se cambió la escala a 3 veces el volumen de transfección, respectivamente. El sobrenadante se eliminó por centrifugación y filtración y después se sometió a cromatografía de afinidad de proteína A convencional (MabSelect SURE, GE Healthcare). Las proteínas se eluyeron y neutralizaron. El procesamiento corriente abajo adicional implicó intercambio de tampón y filtración estéril. Las concentraciones proteicas se determinaron por espectrometría de UV. La pureza de IgG se analizó en condiciones desnaturalizantes, reductoras y desnaturalizantes, no reductoras en SDS-PAGE o usando Agilent BioAnalyzer. Se realizó HP-SEC para analizar las preparaciones de IgG en estado nativo.

40 3C. Caracterización de IgG en ensayo de ELISA

Se usaron IgG para caracterización de unión de ELISA en 4-1BB/Fc humano y 4-1BB/Fc de ratón en una preparación revestida directa. La Tabla 4 a continuación expone los resultados de unión de ELISA para los anticuerpos MOR-6032, MOR-7361, MOR-7480 y MOR-7483 todos en formato IgG1.

Tabla 4. Unión de IgG1 en Ensayo de ELISA

| Anticuerpo | 4-1BB/Fc humano CE50 [nM] | 4-1BB/Fc de ratón |
|------------|------------------------------|-------------------|
| MOR-6032 | 0,2 | - |
| MOR-7361 | 0,3 | - |
| MOR-7480 | 0,7 | (+) |
| MOR-7483 | 0,9 | - |

5 **3D. Selectividad de Unión de Anticuerpos (Ensayo de FACS)**

Se evaluó la selectividad de anticuerpos con respecto a 4-1BB frente a proteína de dominio extracelular de 4-1BB y otros miembros de la superfamilia de TNFR. Estos receptores incluyeron CD40 (TNFRSF5) y OX-40 (CD134, TNFRSF4). Se usaron IgG para caracterización de unión de FACS en células HEK293 de control negativo, así como células HEK293T-h4-1BB transfectadas de forma estable y que expresaban 4-1BB humano y células transfectadas de forma estable 300.19 que expresaban OX-40 y células 300.19 transfectadas de forma estable y que expresaban CD40. Los resultados de unión de FACS para los anticuerpos MOR-6032, MOR-7361, MOR-7480 y MOR-7483, todos en formato IgG1, se presentan en la Tabla 5. No se observó unión significativa a OX-40 o CD40 a concentraciones hasta 1000 nM, lo que demuestra que los anticuerpos son al menos 100 veces más selectivos para 4-1BB frente a otros miembros de la familia relacionada ensayados.

15 **Tabla 5. Selectividad de Unión de Anticuerpos (IgG1) en Ensayo de FACS**

| Anticuerpo | 4-1BB de HEK293T CE ₅₀ [nM] | HEK293 parental | OX-40 de 300.19 | CD40 de 300.19 | 300.19 Parental |
|------------|---|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| MOR-6032 | 0,6 | - | - | - | - |
| MOR-7361 | 0,8 | - | - | - | - |
| MOR-7480 | 0,6 | - | - | - | - |
| MOR-7483 | 0,5 | (+) | - | - | - |

3E. Caracterización de IgG en Ensayo de Gen Indicador de Luciferasa

También se caracterizaron las IgG con respecto a unión en un ensayo de gen indicador de luciferasa usando células HEK293T-h4-1BB en un ensayo unido a placa, un ensayo de unión soluble y ensayo de unión reticulada. La Tabla 6 expone los resultados del ensayo de gen indicador de luciferasa con respecto a anticuerpos MOR-6032, MOR-7361, MOR-7480 y MOR-7483, todos en formato IgG1.

20 **Tabla 6. Caracterización de IgG1 en Ensayo de Gen Indicador de Luciferasa**

| Ensayo de gen indicador de luciferasa de IgG | | | |
|--|---------------|---------|------------|
| Anticuerpo | unido a placa | soluble | Reticulado |
| MOR-6032 | +++ | - | +++ |
| MOR-7361 | + | - | +++ |
| MOR-7480 | + | - | +++ |
| MOR-7483 | + | - | +++ |

Ejemplo 4. caracterización estructural de anticuerpos MOR-6032, MOR-7361, MOR-7480 Y MOR-7483

- 5 Los procedimientos descritos anteriormente en los Ejemplos 1 - 3 se usaron para producir varios anticuerpos IgG2 anti-4-1BB completamente humanos, incluyendo anticuerpos designados "MOR-6032", "MOR-7361", "MOR-7480" y "MOR-7483". Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos monoclonales MOR-6032, MOR-7361, MOR-7480 y MOR-7483 se obtuvieron usando técnicas de PCR convencionales y se secuenciaron usando técnicas de secuenciación de ADN convencionales.
- 10 Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena pesada, cadena pesada de longitud completa de la subclase IgG2, región variable de cadena ligera y cadena ligera de longitud completa de los anticuerpos MOR-6032, MOR-7361, MOR-7480, MOR-7480.1, MOR-7480.2, MOR-7483, MOR-7483.1 y MOR-7483.2 se proporcionan en la presente divulgación; un índice de la SEQ ID NO para estas secuencias se proporciona en la Tabla 1.
- 15 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de MOR-6032 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada de MOR-6032 utiliza un segmento V_H de V_H 1-69 de línea germinal humana, un segmento D de la 4-23 de línea germinal humana y un segmento JH de JH 4a de línea germinal humana.
- 20 El análisis adicional de la secuencia de V_H de MOR-6032 usando el sistema de Kabat de determinación de región CDR condujo a la delimitación de las regiones H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 como se muestran en SEQ ID NO: 1, 2 y 3 respectivamente.
- La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de MOR-7361 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada 7361 utiliza un segmento V_H de V_H 3-23 de línea germinal humana, un segmento D de 2-8 de línea germinal humana y un segmento JH de JH 4a de línea germinal humana.
- 25 Un análisis adicional de la secuencia V_H de MOR-7361 usando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delimitación de las regiones de cadena pesada H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 como se muestra en SEQ ID NO: 15, 16 y 17 respectivamente.
- 30 La comparación de las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada de MOR-7483 y MOR-7480 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostraron que las cadenas pesadas de 7480 y 7483 utilizan un segmento V_H de V_H 5 de línea germinal humana, un segmento D de 5-18 de línea germinal humana y un segmento JH de JH 4a de línea germinal humana.
- El análisis adicional de las secuencias de V_H 7480 y 7483 usando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delimitación de las regiones H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 como se muestran en SEQ ID NO: 29, 30 y 31, respectivamente.
- 35 La comparación de las secuencias de inmunoglobulina de cadena ligera de MOR-6032, MOR-7361, MOR-7480 y MOR-7483 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demuestra que las cadenas ligeras de 6032, 7361, 7480 y 7483 utilizan todas un segmento V_L de λ3-R de línea germinal humana y un segmento JL de JL 3b de línea germinal humana.
- El análisis adicional de la secuencia V_L de MOR-6032 usando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delimitación de las regiones de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestran en SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente.
- 40 El análisis adicional de la secuencia de V_L de MOR-7361 usando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delimitación de las regiones L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 como se muestran en SEQ ID NO: 20, 21 y 22, respectivamente.
- El análisis adicional de la secuencia de V_L de MOR-7480 usando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delimitación de las regiones L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 como se muestran en SEQ ID NO: 34, 35 y 36, respectivamente.
- 45 El análisis adicional de la secuencia de V_L de MOR-7483 usando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delimitación de las regiones L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 como se muestran en SEQ ID NO: 34, 35 y 55, respectivamente.

Ejemplo 5: versiones convertidas a línea germinal de anticuerpos MOR-7480 Y MOR-7483

- 50 Para minimizar la inmunogenicidad de los anticuerpos MOR-7480 y MOR-7483, se retromutaron varios restos aminoacídicos a secuencia de línea germinal, como sigue. Se preparó una versión de línea germinal de MOR-7480, designada MOR-7480.1, devolviendo dos aminoácidos en la región FR1 de la cadena variable pesada a la secuencia de línea germinal. Más específicamente, Q en el resto aminoacídico número 1 se devolvió a la E de línea germinal y K en el resto aminoacídico número 19 se devolvió a R. Los dos restos aminoacídicos que se cambiaron en la región variable de cadena pesada pueden verse comparando la secuencia de aminoácidos de MOR-7480

(SEQ ID NO: 32) con MOR-7480.1 (SEQ ID NO: 43). En la región variable de cadena ligera de MOR-7480, se revirtieron cinco aminoácidos en la región FR1 (D1S, I2Y, A13S, R19S, S21T), dos aminoácidos en la región FR2 (A42S, V45L) y uno en la región FR3 (E80M) a secuencia de línea germinal. Los ocho aminoácidos que se cambiaron en la región variable de cadena ligera pueden verse comparando la secuencia de aminoácidos de MOR-7480 (SEQ ID NO: 37) con la de MOR-7480.1 (SEQ ID NO: 45).

Además, se preparó una tercera versión de MOR-7480 comenzando con la secuencia de región variable de cadena ligera de MOR-7480.1 (SEQ ID NO: 45) y revirtiendo L45 de vuelta a V para producir MOR-7480.2 (SEQ ID NO: 51).

Una versión "convertida a línea germinal" de MOR-7483, designada MOR-7483.1, se preparó retromutando dos aminoácidos en la región FR1 de la cadena variable pesada a secuencia de línea germinal. Las versiones convertidas a línea germinal pueden prepararse comenzando con la versión de línea germinal de la cadena del anticuerpo y cambiando después los aminoácidos deseados en las CDR o cualquier combinación de mutaciones comenzando desde cualquier versión. Para producir MOR-7483.1, Q en el resto aminoacídico número 1 se devolvió a la E de línea germinal y K en el resto aminoacídico número 19 se devolvió a R. Los dos restos aminoacídicos que se cambiaron en la región variable de cadena pesada pueden verse comparando la secuencia de MOR-7483 (SEQ ID NO: 32) con MOR-7483.1 (SEQ ID NO: 43). En la región variable de cadena ligera de MOR-7483, se revirtieron cinco aminoácidos en la región FR1 (D1S, I2Y, A13S, R19S, S21T), dos aminoácidos en la región FR2 (A42S, V45L) y uno en la región FR3 (E80M) a secuencia de línea germinal. Los ocho aminoácidos que se cambiaron en la región variable de cadena ligera pueden verse comparando la secuencia de aminoácidos de MOR-7483 (SEQ ID NO: 56) con la de MOR-7483.1 (SEQ ID NO: 60).

Además, se preparó una tercera versión de MOR-7483 retromutando L45 de la secuencia de región variable de cadena ligera de MOR-7483.1 (SEQ ID NO: 60) a la V45 de línea germinal para producir MOR-7483.2 (SEQ ID NO: 64).

Ejemplo 6: propiedades *in vitro* de anticuerpos, incluyendo versiones convertidas a línea germinal

Afinidades de Unión de Anticuerpos (Ensayo de BIAcore)

Se midieron las cinéticas de unión de ciertos anticuerpos que se unían a 4-1BB humano por tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) usando un instrumento Biacore 3000 (GE Healthcare). Se obtuvo proteína quimérica 4-1BB/Fc humana recombinante que comprendía los aminoácidos 24 - 186 de SEQ ID NO: 68 de R&D Systems Inc. (N.º 838-4B). La proteína liofilizada se disolvió en un tampón que contenía NaCl 150 mM, HEPES 25 mM pH 8,0, MgCl₂ 6 mM, polisorbato 20 0,005 % y azida sódica 0,5 mM a una concentración final de 80 nM basándose en el peso molecular predicho (44,8 kDa) proporcionado por R&D Systems. La parte Fc de la molécula se escindió por tratamiento por factor bovino Xa (Pierce, n.º 32521) en NaCl 150 mM, HEPES 25 mM pH 8,0, MgCl₂ 6 mM, polisorbato 20 0,005 %, azida sódica 0,5 mM, usando una incubación de 20 horas a 22 °C con un Factor Xa 3 % (3 µg de Factor Xa por 100 µg de quimera 4-1BB). La parte de 4-1BB de la molécula comprende los restos aminoacídicos 24 a 186 de la proteína 4-1BB humana. Se llevaron a cabo experimentos de unión a 25 °C en un tampón de ejecución que comprendía NaCl 150 mM, HEPES 25 mM pH 8,0, MgCl₂ 6 mM, polisorbato 20 0,005 % y azida sódica 0,5 mM. Se inmovilizaron anticuerpos por acoplamiento de amina convencional a una microplaca sensora CM5 (GE Healthcare) usando una solución de 0,1 mg/ml del anticuerpo en acetato sódico 10 mM a pH 5,0. El 4-1BB se inyectó a un intervalo de concentraciones de 80 nM a 0,16 nM a un caudal de 50 µl/minuto, durante 3,6 minutos seguido de un periodo de disociación de 26 minutos usando la característica Kinject del instrumento Biacore 3000. El complejo unido se regeneró por un pulso de 1 minuto de ácido fosfórico 10 mM en agua. Se realizó análisis de los datos usando el software Scrubber2 (BioLogic Software). Los sensogramas de ajustaron a un modelo de unión de Langmuir 1:1 sencillo. Se mostró que los anticuerpos se unían de forma reversible a 4-1BB humano recombinante. Los resultados (valores medios) se presentan en la Tabla 7.

Unión a dominio extracelular de 4-1BB (Ensayo de ELISA)

Se resuspendió la quimera de IgG1Fc 4-1BB humana (R&D Systems, Minneapolis, MN) con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) que contenía albúmina de suero bovino (BSA) 0,1 % a 0,2 mg/ml y se diluyó con DPBS a una concentración final de 0,03 µg/ml. Las placas de 96 pocillos Nunc-Immuno Maxisorp se revistieron con 0,1 ml por pocillo de la quimera de 4-1BB recombinante dejando pocillos vacíos para controles de unión no específica y se incubaron a 4 °C durante una noche. La solución de 4-1BB se retiró y las placas se lavaron tres veces con 0,2 ml de tampón de lavado (Tween-20 0,05 % en DPBS). Se añadieron 0,2 ml de tampón de bloqueo (BSA 5 %, Tween-20 0,05 % en DPBS) a todos los pocillos y se incubó a 4 °C durante 1 hora con mezcla. El tampón de bloqueo se retiró y las placas se lavaron tres veces con 0,2 ml de tampón de lavado. Se prepararon diluciones en serie de los anticuerpos de ensayo de 4-1BB en DPBS y se añadió los 0,1 ml de Ab diluido por pocillo. Las placas se incubaron 1,5 horas a temperatura ambiente. Se retiró la solución de anticuerpo y las placas se lavaron tres veces con 0,2 ml de tampón de lavado por pocillo. Se diluyó anticuerpo F(ab')₂ específico de F(ab')₂ anti-IgG humano de cabra marcado con peroxidasa de rábano rústico (Jackson ImmunoResearch n.º 109-036-097, West Grove, PA) 1:5000 con DPBS y se añadieron 0,1 ml por pocillo. Las placas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con 0,2 ml por pocillo de tampón de lavado. Se añadieron 0,1 ml de sustrato de peroxidasa SureBlue TMB microwell (Kirkegaard & Perry Labs, Gaithersburg, MD) y se incubaron durante 20 minutos a

temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo un volumen igual de H₂SO₄ 2 M y se leyó la absorbancia a 450 nm en un Spectra Max 340 de Molecular Devices (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los resultados se presentan en la Tabla 8.

Unión de Competición de Ligando (Ensayo de ELISA)

- 5 Se ensayaron anticuerpos con respecto a su capacidad para bloquear la unión de la quimera de 4-1BB humano_IgG1Fc a ligando de 4-1BB recombinante (4-1BBL) unido a placa. El ligando de 4-1BB humano recombinante (Biosource/Invitrogen, Carlsbad, CA) se resuspendió a 0,2 mg/ml en DPBS + albúmina de suero bovino 0,1 % y después se diluyó a 1 µg/ml en DPBS. Se revistieron placas de 96 pocillos de superficie con Nunc-Immuno MaxiSorp con 0,1 ml/pocillo de la solución de 4-1BBL durante una noche a 4 °C. El día siguiente la solución de 4-1BBL se retiró y se añadieron 0,2 ml de tampón de bloqueo (albúmina de suero bovino 1 %, Tween-20 0,05 % en DPBS) y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Durante la etapa de bloqueo las reservas de anticuerpos se diluyeron en un intervalo de 8 ng/ml a 6 µg/ml en DPBS. Se resuspendió 4-1BB humano – IgG1Fc recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN) a 0,2 mg/ml en DPBS + albúmina de suero bovino 0,1 % y después se diluyó a 0,2 µg/ml en DPBS. Las placas revestidas con 4-1BBL bloqueado se lavaron tres veces con 0,2 ml de tampón de lavado (Tween-20 0,05 % en DPBS). Se añadieron 60 µl de diluciones de anticuerpo junto con 60 µl de quimera 4-1BB_IgG1Fc y se incubaron a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Las placas se lavaron como se ha descrito previamente. Se diluyó anticuerpo antimarcador de 6xHistidina con peroxidasa de rábano rústico (R&D Systems, Minneapolis MN n.º MAB050H) 1:1000 en DPBS, se añadieron 50 µl de la solución resultante a los pocillos de las placas lavadas y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron como se ha descrito previamente, se añadieron 50 µl de solución de sustrato TMB a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. La reacción se detuvo con 50 µl de H₂SO₄ 0,2 N y se leyó la absorbancia a 450 nm usando un lector de placa Molecular Devices. Los resultados se presentan en la Tabla 8.

Reactividad Cruzada de Especies de Anticuerpos

- 25 La reactividad cruzada de especies de los anticuerpos ejemplares se midió usando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) primarias estimuladas con fitohemaglutinina (PHA) de ser humano, mono cynomolgus (cyno), perro y rata. Las células se aislaron de acuerdo con el procedimiento descrito posteriormente. Las células se lavaron (aproximadamente 5,0x10⁵ células/tubo) una vez en tampón de lavado frío (PBS, FBS 2 % y azida sódica 0,02 %) y se añadieron 100 µl/tubo de anticuerpos reactivos a 4-1BB o control conjugado con Alexa Fluor 647 a 15,5 µg/ml (100 nM) a cada muestra junto con anticuerpos marcadores de linfocitos T específicos de especie marcados. Los anticuerpos marcadores de linfocitos T utilizados son los siguientes, FITC anti-CD3e humano (BD Pharmingen, n.º 555332), FITC anti-CD3e de rata (BD Pharmingen, n.º 559975), FITC anti-CD4 de conejo + FITC anti-CD8 de conejo (AbD Serotec, n.º MCA799F y n.º MCA1576F), FITC anti-CD3e de perro (AbD Serotec, n.º MCA1774F) y PerCP anti-CD3e humano/cyno (BD Pharmingen, n.º 552851). Las células se incubaron en la oscuridad con anticuerpos de fluorocromo en hielo durante 30 minutos, se lavaron tres veces y se resuspendieron en 0,3 ml de tampón de lavado para análisis. La tinción del anticuerpo se midió y analizó usando un software Becton Dickinson FACS Calibur y FlowJo 8.8.2.

- 40 Aislamiento de linfocitos T humanos. Se recogió sangre completa humana en jeringas que contenían 1 ml de EDTA 0,5 M y se transfirieron después a tubos Sigma Accuspin (Sigma, St. Louis, MO) para el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como se describe por el fabricante. Las PBMC se lavaron dos veces con DPBS que contenía EDTA 5 mM y se aislaron linfocitos T usando una columna de purificación de linfocitos T como se describe por el fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN). Brevemente, las PBMC se resuspendieron en 2 ml de tampón de columna y se cargaron en una columna de aislamiento de linfocitos T prelavada. Las PBMC se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y los linfocitos T se eluyeron con tampón de columna, se lavaron una vez y se resuspendieron en TCM a 2x10⁶ células/ml que consistía en RPMI 1640 (Sigma, St Louis, MO) complementado con suero bovino fetal al 10 % (Sigma, St Louis, MO) y L-glutamina (2 mM), Hepes (10 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomina (50 µg/ml) (Gibco, Grand Island, NY.).

- 50 Aislamiento de PBMC de Cynomolgus. Se recogió sangre completa de cynomolgus (Bioreclamation; Hicksville, NY) en tubos vacutainer CPT de citrato sódico (BD; Franklin Lakes, NJ) y después se centrifugó a 1500 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se enviaron durante una noche a 4 °C. Se recogió la fracción de PBMC de los tubos CPT y se lavó 2x con PBS que contenía EDTA 5 mM. Después de la etapa de lavado, las PBMC se contaron y se reajustaron a 2x10⁶ células/ml en medio de cultivo tisular (TCM). El TCM consistía en RPMI 1640 (Sigma, St Louis, MO) complementado con suero bovino fetal al 10 % (Sigma, St Louis, MO) y L-glutamina (2 mM), HEPES (10 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomina (50 µg/ml) obtenida de Gibco (Grand Island, NY.). Las células se estimularon con PHA 10 µg/ml 2-3 días para inducir expresión de 4-1BB.

- 55 Aislamiento de PBMC caninas. Se extrajo sangre completa canina en tubos vacutainer heparinizados (BD; Franklin Lakes, NJ) y se diluyó 1:2 con PBS que contenía EDTA 5 mM. Después de mezclar, se depositaron 4 ml de la sangre diluida cuidadosamente sobre 3 ml de Lympholyte-Mammal (Cedarlane Laboratories, Westbury, NY) y se centrifugó a 800 x g durante 20 minutos a 25 °C. Se recogió la interfaz de PBMC, se lavó dos veces con PBS y se resuspendió a 2x10⁶ células/ml en TCM que contenía PHA a 10 µg/ml (Remel, Lenexa, KS). Las células se

cultivaron durante 48-72 horas antes de ensayar con respecto a unión de anticuerpo por citometría de flujo.

- 5 Aislamiento de PBMC de rata. Se extrajo sangre completa de rata en tubos vacutainer heparinizados (BD; Franklin Lakes, NJ) y se diluyó 1:3 con PBS que contenía EDTA 5 mM. Después de mezclar, se depositaron 6 ml de la sangre diluida cuidadosamente sobre 4,5 ml de Lympholyte-Mammal (Cedarlane Laboratories, Westbury, NY) y se centrifugó a 800 x g durante 20 minutos a 25 °C. Se recogió la interfaz de PBMC, se lavó dos veces con PBS y se resuspendió a 2×10^6 células/ml en TCM que contenía PHA a 10 µg/ml (Remel, Lenexa, KS). Las células se cultivaron durante 48-72 horas antes de ensayar con respecto a unión de anticuerpo por citometría de flujo.

- 10 Los resultados de ensayo se proporcionan en la Figura 1. Se descubrió que los anticuerpos se unían al 4-1BB humano y cyno con alta afinidad, mientras que la unión a 4-1BB de perro y rata no se observó a concentraciones de 100 nM, la mayor concentración ensayada.

Tabla 7: Afinidades de Unión de Anticuerpos IgG (Biacore)

| Anticuerpo | k_a ($M^{-1} s^{-1}$) | k_d (s^{-1}) | K_D (nM) | $t_{1/2}$ |
|-------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------|-----------|
| MOR7480 (IgG1) | $3,6 \times 10^5$ | $1,5 \times 10^{-4}$ | 0,42 | 82 min |
| MOR7480 (IgG2) | $4,5 \times 10^5$ | $2,3 \times 10^{-4}$ | 0,57 | 50 min |
| MOR-7480.1 (IgG1) | $1,2 \pm 0,3 \times 10^6$ | $9,8 \pm 0,15 \times 10^{-3}$ | $8,4 \pm 1,4$ | 1,2 min |
| MOR-7480.1 (IgG2) | $1,4 \pm 0,06 \times 10^6$ | $1,2 \pm 0,1 \times 10^{-2}$ | $8,7 \pm 1,0$ | 1,0 min |
| MOR-7480.2 (IgG1) | $9,3 \times 10^5$ | $4,1 \times 10^{-4}$ | 0,4 | 28 min |
| MOR-7483 (IgG1) | $6,0 \times 10^5$ | $4,4 \times 10^{-4}$ | 0,73 | 26 min |
| MOR-7483 (IgG2) | $3,0 \times 10^5$ | $3,8 \times 10^{-4}$ | 1,3 | 1,3 min |
| MOR-7483.1 (IgG1) | $8,0 \times 10^5$ | 0,022 | 28 | 32 min |

Tabla 8: Valores de Competición de Ligando y Unión de ELISA

| Anticuerpo | Isotipo | ELISA de Unión | ELISA de Competición de Ligando | |
|------------|---------|----------------|---------------------------------|--------------|
| | | CE50±DT (nM) | % de inhibición máxima | CI50±DT (nM) |
| MOR-6032 | IgG1 | 0,071± 0,029 | 100±2 | 0,153±0,067 |
| MOR-6032 | IgG4 | 0,226± 0,161 | 100±2 | 0,112±0,023 |
| MOR-7361 | IgG1 | 0,091± 0,010 | 100±2 | 0,172±0,006 |
| MOR-7480 | IgG1 | 0,076± 0,008 | 96±2 | 0,122±0,019 |
| MOR-7480 | IgG2 | 0,122± 0,009 | 98±2 | 0,125±0,003 |
| MOR-7483 | IgG1 | 0,073± 0,024 | 98±2 | 0,109±0,028 |
| MOR-7483 | IgG2 | 0,165± 0,035 | 97±2 | 0,138±0,015 |

Mapeo de Epítotos

- 15 Para determinar la región de unión al epítoto de los anticuerpos agonistas de 4-1BB, se realizaron una serie de mutaciones (Tabla 9) al dominio extracelular de 4-1BB humana para la secuencia publicada de 4-1BB de perro (Ref. Sec. XM_845243).

Tabla 9. Mutante de Dominio Extracelular de 4-1BB humano

| Mutante de dominio extracelular de 4-1BB humano | Cambios de Aminoácidos |
|---|---|
| Hu41BB N&E | N30K, A56T, G57S, R60K, T61A |
| Hu41BB N&E.1 | N30K, D38G, N39K, R41K, S46I, A56T, G57S, R60K, T61A |
| Hu41BB N&E.2 | N30K, A56T, G57S, R60K, T61A, K69E, R75K, E77V |
| Hu41BB N&E.3 | L24I, P27S, N42S, T89I, P90S, S100T |
| Hu41BB N&E.4 | L24I, P27S, N30K, D38G, N39K, R41K, N42S, S46I, A56T, G57S, R60K, T61A, K69E, R75K, E77V, T89I, P90S, S100T |
| Hu41BB N&E.5 | K115Q, C121R, R134Q, R154S, V156A |
| Hu41BB N&E.6 | S161A, P162S, D164G, L165F, A169T |

5 Todas las mutaciones de humano a perro se prepararon por Gene Dynamics LLC, (Portland, OR) en el vector de expresión retroviral pMSCVpuro (Clontech Laboratories Mountain View, CA). Adicionalmente se preparó la secuencia de ADNc canina completa mediante síntesis génica correspondiente a Ref. Sec. XM_845243.

Se establecieron preparaciones virales por transfección transitoria de células 293T confluyentes a aproximadamente 40-50 % en matraces T-75. Después del cultivo, el sobrenadante viral se filtró entonces de forma estéril y se sometió a concentración. El virus concentrado se recogió y almacenó a -80 °C.

10 Se transdujeron células 300-19 que crecían de forma logarítmica con retrovirus usando dilución 1:250 de virus concentrado más polibreno 8 ug/ml en DMEM. Después de una incubación de 24 horas, se añadió puomicina 2 ug/ml a los cultivos y se mantuvo durante el transcurso del estudio.

15 Se confirmó la expresión positiva de los receptores 4-1BB por los grupos seleccionados por puomicina mediante tinción con anticuerpo anti-4-1BB humano de cabra policlonal 1 ug/ml (R&D Systems Inc.) más F(ab')₂ anti-IgG (H+L) de cabra de burro marcado con PE en dilución 1:200 (Jackson Immunoresearch Inc.). Para determinar el reconocimiento de los receptores 4-1BB mutantes por los anticuerpos de ensayo los grupos seleccionados por puomicina se tiñeron con dilución 100 nM del anticuerpo primario no marcado en hielo durante 30 minutos, seguido de dos lavados con tampón FACS y F(ab')₂ anti-IgG (H+L) de burro marcado con PE específico de especie en dilución 1:200. Las células se analizaron mediante FACS usando un software BD FACS Calibur y FlowJo 8.8.6.

La tinción relativa de cada grupo de células se resume en la Tabla 10.

20 Tabla 10. Tinción Relativa de Cada Grupo de Células

| Ab | h41BB | N&E | N&E.1 | N&E.2 | N&E.3 | N&E.4 | N&E.5 | N&E.6 | 41BB de perro |
|--------------|-------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|
| pAb de cabra | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| BBK-2 | + | + | - | + | + | - | + | + | - |
| JG1.6A | + | + | - | + | + | - | + | + | - |
| 4B4-1 | + | + | - | + | + | - | + | + | - |

(continuación)

| Ab | h41BB | N&E | N&E.1 | N&E.2 | N&E.3 | N&E.4 | N&E.5 | N&E.6 | 41BB de perro |
|-----------|-------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|
| 6032_G1 | + | + | + | - | + | - | + | + | - |
| 7361_G1 | + | + | + | - | +/- | - | + | + | - |
| 7480_G1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 7480.1_G1 | + | + | + | + | + | + | - | + | - |
| 7480.1_G2 | + | + | + | + | + | + | +/- | + | - |
| 7480.2_G1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 7483_G1 | + | + | + | + | + | + | +/- | + | +/- |
| 7483_G2 | + | + | + | + | + | + | - | + | - |

La diferenciación de unión entre anticuerpos que tienen secuencias similares (MOR-7480, MOR-7480.1, MOR-7480.2, MOR-7483 y MOR-7483.1) se descubrió dentro de las mutaciones del clon N&E.5, lo que sugiere que los determinantes para el reconocimiento de anticuerpos quedan dentro de la región mutada.

5 Para determinar la afinidad relativa de estos anticuerpos por el dominio extracelular de 4-1BB humano y el mutante del dominio extracelular de 4-1BB humano, mutante N&E.5, se determinó una curva de FACS de respuesta a dosis para cada anticuerpo. Se diluyeron MOR_7480, MOR_7480.1 y MOR_7480.2 marcados con Alexa Fluor 647 en tampón FACS desde 1 μ M en una serie de diluciones 1:5 de 8 puntos y se usaron para teñir grupos de células parentales 300-19, hu4-1BB, hu4-1BB N&E.5 y 4-1BB de perro. Las células se analizaron por FACS usando un software BD FACS Calibur y FlowJo 8.8.6. La fluorescencia geométrica media de cada grupo que expresaba receptor se normalizó a tinción de células parentales y se expresó como tinción en veces y se determinó una CE50 para respuesta a dosis. El sumario de CE50 se muestra en la Tabla 11. Se observó una reducción mayor de 5 veces en la unión para tanto MOR_7480.2 como MOR_7480 para el mutante de 4-1BB humano N&E.5.

Tabla 11. CE₅₀ (nM) de Unión de Anticuerpos

| Anticuerpo (IgG1) | 4-1BB humano | 4-1BB mutante N&E.5 |
|-------------------|--------------|---------------------|
| MOR_7480.1 | 7,916 | n/d |
| MOR_7480.2 | 0,510 | 2,730 |
| MOR_7480 | 1,68 | 12,29 |

Actividad Agonista de Anticuerpos (Ensayo de Actividad de Luciferasa)

15 Se prepararon células 293T que expresaban 4-1BB humano junto con un indicador de luciferasa NF κ B integrado de forma estable. Las células se recogieron, se lavaron y se resuspendieron en medio completo sin rojo fenol (DMEM que contenía suero bovino fetal 10 %, tampón HEPES, aminoácidos no esenciales y L-glutamina) a una densidad de $0,6 \times 10^6$ células/ml. Se sembraron 50 μ l de células en cada pocillo de ensayo de una placa de 96 pocillos blanca (PerkinElmer, Waltham, MA). Se añadieron anticuerpos de ensayo a cada pocillo en presencia de una relación 2,5:1 de un Fc anti IgG humano de cabra de Fab' de anticuerpo de entrecruzamiento (Jackson ImmunoResearch, West

20

Grove, PA). La placa se incubó 5 horas a 37 °C. Se añadieron 75 µl de reactivo luciferasa Bright-Glo (Promega, Madison Wi) y se midió la cantidad de actividad luciferasa usando un contador de centelleo TopCount NXT de Packard.

5 Se prepararon células 293T que expresaban 4-1BB de mono cynomolgus por transducción viral y selección de un grupo estable con puromicina 2 µg/ml. Se sembraron en placas células 293T que expresaban 4-1BB Cyno en un
 10 matraz T-75 a aproximadamente 60-70 % de confluencia, después se transfectaron con 10 µg de pLuc_6xNFkB más 0,1 µg de pRL-CMV como un control de transfección. Se realizaron transfecciones usando reactivo de transfección Fugene 6 (Roche Indianapolis, IN) a una relación de 1 µg de ADN plasmídico con 6 µl de Fugene de acuerdo con la
 15 instrucciones del fabricante. Las células se recogieron al día siguiente, se lavaron y se resuspendieron en medio completo sin rojo fenol (DMEM que contenía suero bovino fetal al 10 %, aminoácidos no esenciales y L-glutamina) a una densidad de 0,6 X 10⁶ células/ml. Se sembraron 50 µl de células en cada pocillo de ensayo de una placa de 96 pocillos blanca (PerkinElmer, Waltham, MA). Se añadieron anticuerpos de ensayo a cada pocillo en presencia de una relación 2,5:1 de un anticuerpo Fc anti-IgG humano de cabra Fab' de entrecruzamiento (Jackson
 20 ImmunoResearch, West Grove, PA). La placa se incubó 5 horas a 37 °C. Se añadieron 75 µl de reactivo de ensayo de luciferasa y la cantidad de actividad luciferasa de luciérnaga se midió usando un contador de centelleo Packard TopCount NXT. Adicionalmente, se añadieron 75 µl de reactivo Stop & Glo para evaluar la actividad de luciferasa de renilla. La cantidad de actividad luciferasa de renilla se midió usando un contador de centelleo Packard TopCount NXT. Los resultados se presentan en la Figura 2.

Actividad Agonista de Anticuerpos (Ensayo de liberación de IL-2 de linfocitos T primarios)

20 Se esterilizaron por UV placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp antes del revestimiento de placa. Se diluyeron anticuerpos de ensayo en PBS a 60 µg/ml. Se diluyeron 0,2 ml del Ab diluido en 2 pocillos de una placa de 96 pocillos de polipropileno y se diluyó en serie 1:3. Se añadieron 50 µl del Ab diluido a la placa de ensayo de 96 pocillos Maxisorp estéril e inmediatamente se añadieron 50 µl de clon UCHT1 anti CD3ε humano 20 µg/ml (Biolegend San Diego, CA). Todas las placas se incubaron después durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, las
 25 placas revestidas con Ab se lavaron 1x con PBS y se añadieron 0,15 ml de medio completo RPMI a los pocillos de las placas Nunc Maxisorp. Se aislaron linfocitos T humanos como se ha descrito previamente en otro sitio del presente documento y se añadieron 50 µl de linfocitos T purificados a 2 x 10⁶ células/ml (100.000 células/pocillo) a cada pocillo. Las células se incubaron a 37 °C, CO₂ 5 % durante 3 días. El sobrenadante de cada pocillo se recogió y se ensayó inmediatamente o se almacenó a -20 °C antes del ensayo. Los sobrenadantes se diluyeron con medio completo antes de ensayo ELISA de IL-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN). Los resultados se presentan en la
 30 Figura 3.

Ejemplo 7: expansión de leucocitos humanos inducida por anticuerpos de 4-1BB *in vivo*

La falta de reactividad cruzada detectable de los anticuerpos de 4-1BB con el 4-1BB murino y el requisito de la presencia de células inmunes humanas requería el desarrollo de modelos para la valoración funcional *in vivo* de los
 35 anticuerpos de 4-1BB. Los ratones con el fondo genético NOD que portan mutación inmunodeficiente combinada grave (SCID) y deficiencia en la cadena gamma común del receptor de IL-2 (habitualmente denominada NSG) son capaces de soportar el injerto de un gran número de leucocitos de sangre periférica humana (huPBL) y mantener el injerto durante al menos 30 días (King, 2008, Clin. Immunol. 126:303-314). Este modelo de ratón, también conocido como modelo huPBL-NSG, se usó para evaluar el efecto funcional de la administración sistémica *in vivo* de los
 40 anticuerpos en células inmunes humanas. Específicamente, se transfirieron de forma adoptiva 6 millones de PBMC humanas recién aisladas mediante inyección intravenosa en ratones huésped NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG). Nueve días después de las inyecciones de PBMC, se administró a los animales una dosis sencilla de 1 mg/kg de MOR7480, MOR7480.1 o anticuerpo de control de isotipo IgG2 mediante inyección intraperitoneal. El día 24 a 28 después del injerto de PBMC, se tiñeron las PBMC con anticuerpos para CD45 humano y murino evaluado mediante
 45 citometría de flujo directa. Se usaron perfiles de dispersión lateral y frontal para determinar una selección de linfocitos. Como se muestra en la Figura 4, MOR7480 y MOR7480.1 fueron capaces de potenciar la expansión de leucocitos humanos como resulta evidente por el aumento de la proporción de linfocitos CD45+ humanos en la sangre periférica de ratones injertados. Para cada grupo, n≥6 ratones.

Además, el tratamiento con MOR7480.1 de monos cynomolgus aumentó la proliferación entre linfocitos T de memoria central citotóxicos (CD8 T_{CM}) en muestras de PBMC. Se proporcionó a monos cynomolgus (2 animales por nivel de dosis) una inyección intravenosa sencilla de MOR7480.1 a la dosis indicada. Se recogieron PBMC 7 días antes de la dosis de anticuerpo (predosis) y los días de estudio indicados en relación con la administración de MOR7480.1 (el día del estudio 1). Las PMBC se tiñeron con anticuerpos para CD3, CD4, CD8, CD28, CD95 y Ki-67 y se analizaron mediante citometría de flujo. Se recogieron datos en un Canto II (Beckton Dickinson) y se analizaron usando software DIVA (Beckton Dickinson). Se identificaron las células de memoria central CD8 como CD3+, CD8+,
 50 CD28+ y CD95+. Se muestran los datos para animales individuales designados como (nivel de dosis-número de animal) y se representan como cambio intraanimal en el número de células Ki-67+ en relación con el número preestudio $\{[(n.^{\circ} \text{ de células Ki-67+ el día del estudio indicado} - n.^{\circ} \text{ de células Ki-67+ en predosis})/n.^{\circ} \text{ de células Ki-67+ en predosis}] * 100\}$. Como se muestra en la figura 5, un aumento de 1,5 veces o mayor en la proliferación de linfocitos T de memoria centrales durante los primeros 7-13 días del estudio se observó en al menos un animal de
 60

todos los grupos tratados con 0,3 mg/kg o más.

Ejemplo 8: actividad antitumoral de anticuerpos de 4-1BB (modelo *in vivo*)

Modelo de cáncer de próstata humana pc3

5 La falta de reactividad cruzada de roedores de los anticuerpos de 4-1BB evitó el uso de modelos tumorales de xenotrasplante humano o singénico murino convencionales para la evaluación de eficacia antitumoral humana de los anticuerpos. En consecuencia, se generó un nuevo modelo de ratón de tumor xenogénico huPBL-SCID-Bg usando un ratón SCID-Bg (CB.17/lcr.Cg Pkrdc^{scid}Lyst^{bg}/Crl), que alberga la mutación beige (Bg) sin linfocitos T y B murinos ni células NK funcionales. La eficacia antitumoral humana de los anticuerpos de 4-1BB se evaluó usando este modelo como se describe posteriormente.

10 Se obtuvo la línea celular de colon humano LOVO o de próstata humana PC3 de la Colección Americana de Cultivos Tipo y se cultivó en RPMI-1640 (Invitrogen) enriquecida con los siguientes complementos de Invitrogen: L-Glutamina, piruvato sódico, aminoácidos no esenciales, penicilina/estreptomina, Hepes y suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (FBS; Cat. N.º F2442, Sigma Aldrich). Se cultivaron las células hasta confluencia en matraces Falcon T-225. Posteriormente, las células se tripsinizaron (Tripsina 0,25 %-EDTA; Cat. N.º 2500-056, Invitrogen) y el crecimiento se cambió de escala en Hyperflasks (Cat. N.º 3319 Corning Life Sciences) durante tres días. Se usó tripsina para recoger la línea celular que se lavó tres veces en PRMI helado complementado con FBS 10 %. Se recogió no más de 300 ml de sangre periférica de voluntarios sanos. Se aislaron linfocitos de sangre periférica (PBMC) de sangre heparinizada usando tubos Accuspin de acuerdo con el protocolo del fabricante (Cat. N.º A0561-100x 15 ml, Aldrich). Se combinaron suspensiones celulares contadas de modo que cada ratón recibió una inyección de $1,5 \times 10^6$ PBMC y 3×10^6 células tumorales en una inyección de embolada sencilla de 0,2 ml en PBS. La suspensión celular combinada se lavó dos veces con PBS frío, se colocó en hielo y se inyectó inmediatamente en ratones preparados.

25 Para cada ratón, se inyectó un volumen de 0,2 ml de la suspensión celular combinada por vía subcutánea en el flanco derecho del animal y se proporcionó una dosis sencilla (0,2 ml) del anticuerpo de 4-1BB o anticuerpo de control por inyección subcutánea en el flanco izquierdo. Se realizaron mediciones de tumor mediante calibrador Pressier dos veces por semana durante el transcurso de los experimentos y también se registraron los pesos corporales. Se calculó el volumen tumoral usando el siguiente cálculo: longitud x anchura² x 0,44 = volumen (mm³). Se retiró a los ratones del estudio en el caso de que el volumen tumoral alcanzara 2000 mm³ o un animal perdiera 20 % del peso corporal antes del final del experimento. El día 23 los ratones de todos los grupos se sacrificaron de acuerdo con procedimientos descritos por el IACUC (Figura 6). Se midió el porcentaje de inhibición de crecimiento tumoral el día final del estudio y se calcula como $100 - \{1 - (\text{Tratado}_{\text{día final}} / \text{Control}_{\text{día final}})\}$. Se observaron resultados similares cuando los tumores se midieron el día 6 después de la inyección y los animales se seleccionaron aleatoriamente de acuerdo con el volumen tumoral y se les suministró una dosis de mAb de 4-1BB sencilla el día 7 después de la implantación. Para la mayoría de los estudios, cada grupo contenía 8 ratones.

Ejemplo 9: evaluación *in vivo* de actividad de anticuerpos DE 4-1BB en ratones Knock In de 4-1BB humano

Generación de ratones knock in para 4-1BB humano

35 Para dirigir mejor las actividades moduladoras inmunes de anticuerpos monoclonales anti-4-1BB humano que no reaccionan de forma cruzada con 4-1BB murino, se generó un modelo de ratón en el que el gen de 4-1BB de ratón se reemplazó con el gen de 4-1BB humano. Se obtuvieron clones de cromosoma artificial de bacteria (BAC) que portaban el fragmento genómico de 4-1BB murino o humano de Invitrogen (Carlsbad, CA) y se usaron para construir el vector de dirección de 4-1BB basándose en la tecnología de recombinación Red/ET (Zhang, 1998, Nat Genet 20:123-128). Primero, se ensambló un vector de recuperación en la cadena principal de pBR322 de modo que, cuando se abran por digestión con Xba1, las dos ramas de homología quimérica humana/murina (400 pb cada una) recuperarán del clon de BAC de 4-1BB humano las 19.994 pb de la secuencia genómica de 4-1BB humano comenzando con el codón de comienzo de la traducción ATG localizado en el exón 2 y terminando con el codón de terminación TGA en el exón 8. Segundo, se ensambló un casete de expresión de neomicina bajo el control de los promotores PGK/EM7 y se flanqueó con 100 pares de bases (pb) de secuencias homólogas a las secuencias del intrón 2 del gen de 4-1BB humano. Este casete de expresión de neomicina se dirigió después al fragmento genómico de 4-1BB humano recuperado obtenido en la etapa 1. Finalmente, el fragmento genómico de 4-1BB humano recuperado que portaba el casete de expresión de neomicina se dirigió a un clon de BAC murino para reemplazar el gen de 4-1BB murino con el fragmento genómico de 4-1BB humano modificado desde el codón de inicio ATG al codón de parada TGA.

55 Este vector de dirección BAC se introdujo por electroporación en una línea de células madre embrionarias de ratón en el fondo C57BL/6NTAC (PRX-BL6N n.º 1, Primogenix, Laurie, MO.) siguiendo un protocolo convencional y se exploraron los clones que sobrevivían a selección por G418 (también conocido como geneticina) mediante dos ensayos de Taqman contra intrón 2 y exón 8 del gen de 4-1BB murino para identificar clones que se habían modificado en el locus 4-1BB murino por un mecanismo de recombinación homóloga. De los 116 clones de ES explorados, se descubrió que 7 clones habían perdido un alelo del locus de 4-1BB murino (eficacia de dirección

6 %). Se realizó análisis de cariotipo e hibridación *in situ* (FISH) por el Instituto Coriell para Investigación Médica (Camden, N.J.). Para el clon LH15, 19 de 20 células fueron 40 XY y para LH80, 20 de 20 células, 40 XY. En ambos clones, la FISH usando un clon de BAC murino que portaba el gen de 4-1BB como una sonda mostró una señal de hibridación de 4-1BB en cada uno del par de cromosomas 4 en la región de la banda E2. No se vio señal en ninguna otra localización.

5 Ambos clones LH15 y LH80 se inyectaron en blastocistos de la cepa BALB/c y se implantaron los embriones en los ratones hembra pseudoembarazadas CD1 para llevarlas a término. Se aparearon quimeras masculinas con ratones Ella-cre en fondo C57BL/6 para retirar el casete de resistencia a neomicina y se usaron ratones homocigotos para el gen de 4-1BB humano en el estudio.

10 Proliferación de linfocitos mediada por mAb agonista de 4-1BB

La capacidad de mAb agonistas de 4-1BB para inducir proliferación de linfocitos se evaluó en ratones knock in 4-1BB. Se suministró a ratones knock in 4-1BB mediante inyección intraperitoneal MOR7480.1 30 mg/kg el día de estudio 0 (para dosificación semanal los animales recibieron inyecciones de mAb de 4-1BB el día 0 y el día 7). 24 horas antes de la recogida de muestras, se inyectó a los animales por vía intraperitoneal 2 mg de BrdU. El día 15 indicado después de la dosis, se recogieron muestras de sangre periférica mediante punción intracardiaca. Las PBMC se tiñeron con anticuerpos contra CD3, CD4, CD8 y BrdU y se evaluaron mediante citometría de flujo. Los resultados se presentan en la Figura 7 panel A.

Eficacia antitumoral mediada por mAb agonista de 4-1BB

20 La eficacia antitumoral de MOR7480.1 se evaluó en ratones knock in de 4-1BB usando B16 - OVA/luc, una línea de melanoma que se ha obtenido por ingeniería genética para expresar el antígeno modelo de ovoalbúmina (OVA) y luciferasa (luc). Se implantaron un millón de células tumorales en el flanco de ratones knock in de 4-1BB. Se seleccionó aleatoriamente a los animales basándose en el tamaño de tumor cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 50-100 mm³ (generalmente 7-10 días después de inoculación del tumor) y se les suministró una inyección sencilla de la dosis indicada de mAb de 4-1BB. El tamaño del tumor se evaluó usando medición con 25 calibrador de dos a tres veces por semana hasta el final del estudio. Los resultados se presentan en la Figura 7 panel B.

LISTADO DE SECUENCIAS

- SEQ ID NO 1: H-CDR1 de anticuerpo MOR-6032
NSYAIS

30 - SEQ ID NO 2: H-CDR2 de anticuerpo MOR-6032
GIIPGFGTANYAQKFQG
- SEQ ID NO 3: H-CDR3 de anticuerpo MOR-6032

RKNEEDGGFDH

- SEQ ID NO 4: Secuencia de Aminoácidos de V_H de anticuerpo MOR-6032

35 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFNSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPGFGT
ANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARKNEEDGGFDHWGQGT
LVTVSS

- SEQ ID NO 5: Secuencia de Aminoácidos de Cadena Pesada de Longitud Completa (IgG2) de anticuerpo MOR-6032

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFNSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPGFGT
ANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARKNEEDGGFDHWGQGT
VTVSSastkqpsvflapcsrstsestaalgclvkdyppepvtswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssnfg
tqtytcnvdhkpsntkvdkterkccvecppcpappvagpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwy
vdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwlngkeykckvsnkglpapiektisktkgqprepvytlppsreemtk
nqvsitclvkgfypsdiavewesngqpennykttppmlsdsgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqksl
slspgk

40 - SEQ ID NO 6: L-CDR1 de anticuerpo MOR-6032
SGDNLGDYYAS

ES 2 699 648 T3

- SEQ ID NO 7: L-CDR2 de anticuerpo MOR-6032
DDSNRPS

- SEQ ID NO 8: L-CDR3 de anticuerpo MOR-6032
QTWDGTLHFV

5 - SEQ ID NO 9: Secuencia de Aminoácidos de V_L de anticuerpo MOR-6032

**DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLGDYYASWYQQKPGQAPVLIYDDSNRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQTWDGTLHFVFGGGTKLTVL**

- SEQ ID NO 10: Secuencia de Aminoácidos de Cadena Ligera de Longitud Completa de Anticuerpo MOR-6032

**DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLGDYYASWYQQKPGQAPVLIYDDSNRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQTWDGTLHFVFGGGTKLTVL***gqpkaapsvtlfp
psseelqankatlvlclisdfypgavtvawkadsspvkagvettpskqsnkyaassylstpeqwkshrsycqvtheg
stvektvaptecs*

- SEQ ID NO 11: Secuencia de Ácido Nucleico de V_H de anticuerpo MOR-6032

*Caggtgcaattgggtcagctctggcgcggaagtgaaaaaaccgggcagcagcgtgaaagtgagctgcaaagcctcggg
aggcacttttaattcttatgctatttctgggtgcgccaagcccctggcagggctcagagtgatggcggtatcattccgggt
ttggcactgcgaattacgcgcagaagttcagggccgggtgaccattaccgcggatgaaagcaccagcaccgcgtatat
ggaactgagcagcctgcgtagcgaagatacggccgtgtattattgcgcgcgtaagaatgaggaggatggtggtttgatca
ttggggccaaggcaccctggtgacggttagctca*

10

- SEQ ID NO 12: Secuencia de Ácido Nucleico de V_L de anticuerpo MOR-6032

*Gatatgcaactgaccagccgccttcagtgagcgttcaccaggtcagaccgcgcgtatctcgtgtagcggcgataatctt
ggtgattattatgcttcttggtaccagcagaaaccggggcaggcgcagttcttctgattatgatgattctaactgcctccag
gcatcccggaacgcttagcggatccaacagcggcaacaccgcgaccctgaccattagcggcactcaggcgggaagac
gaagcggattattatgcccagacttgggatgggtactctcattttgtgtttggcggcgccacgaagtaaccgttctt*

- SEQ ID NO 13: Secuencia de Ácido Nucleico de Cadena Pesada de Longitud Completa de Anticuerpo MOR-6032

cagggtgcaattgggtcagctcggcgcggaagtgaaaaaccgggcagcagcgtgaaagtgagctgcaaagcctccgga
 ggcacttttaattcttatgctatttcttgggtgcgccaagcccctgggcagggtctcgagtggatgggcggtatcattccgggtt
 tggcactgcgaattacgcgcagaagtccagggccgggtgaccattaccgcggatgaaagcaccagcaccgcgtatag
 gaactgagcagcctgcgtagcgaagatacggccgtgtattattgcgcgcgtaagaatgaggaggatgggtggtttgatcatt
 ggggccaaggcaccctgggtgacgggttagctcagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcgccctgctccagg
 agcacctccgagagcacagcgccctgggctgcctggtaaggactactccccgaaccgggtgacgggtgctgtggaact
 caggcgctctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtcctacagctcctcaggactctactcctcagcagcgtagta
 ccgtgccctccagcaactcggcaccagacctcacctgcaacgtagatcaaaagcccagcaaacaccaaggtggac

aagacagttgagcgcgcaaatgttgtcagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagcttctcttcc
 ccccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccctgagggtcagctgctgggtgggagcgtgagccacgaag
 accccgaggtccagttcaactggtagcgtggacggcgtggagggtcataatgccaagacaaagccacgggaggagcag
 ttcaacagcacgttccgtgtggtagcgtcctcaccgtcgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaa
 ggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaacctctccaaaaccaaagggcagccccgagaaccacag
 ggtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgctggtaaaaggcttctacc
 ccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctcccctgctgga
 ctccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctc
 cgtgatgatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctcccctgctccgggtaaa

- SEQ ID NO 14: Secuencia de Ácido Nucleico de Cadena Ligera de Longitud Completa de Anticuerpo MOR-6032

Gatatgcaactgaccagccgcctcagtgagcgtgcaccagggtcagaccgcggtatctcgtgtagcggcgataatctt
 ggtgattattatgcttcttggtagcagcagaaccggggcaggcggcagttcttctgatttatgatgattctaactgctccctcag
 gcatcccggaaacgcttagcggatccaacagcggcaaacaccgagaccctgaccattagcggcactcaggcgggaagac
 gaagcggattattattgccagacttgggatggtagctctcattttgtgtttggcggcgccacgaagtaaccgttcttggtagcc
 caaggctgccccctcggtagctctgttcccaccctcctctgaggagctcaagccaacaaggccacactggtgtgtctcata
 agtgacttctacccgggagccgtgacagtggcctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggagtgagaccac
 cacaccctocaaacaaagcaacaacaagtagcggccagcagctacctgagcctgagcctgagcagtggaagtccc
 acagaagctacagctgccaggtcacgcatgaaggagcaccgtggagaagacagtgggccctacagaatgttca

- SEQ ID NO 15: H-CDR1 de anticuerpo MOR-7361
SDYYMH

- SEQ ID NO 16: H-CDR2 de anticuerpo MOR-7361
VISGSGSNTYYADSVKG

- SEQ ID NO 17: H-CDR3 de anticuerpo MOR-7361
RLYAQFEGDF

- 10 - SEQ ID NO 18: Secuencia de Aminoácidos de V_H de anticuerpo MOR-7361

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMHWVRQAPGKGLEWVSVISGSGS
NTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLYAQFEGDFWGGTL
VTVSS

- SEQ ID NO 19: Secuencia de Aminoácidos de Cadena Pesada de Longitud Completa (IgG2) de anticuerpo MOR-7361

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMHWVRQAPGKGLEWVSVISGSGS
NTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLYAQFEGDFWGGTL
VTVSSastkgpsvfplapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssgyls svvtvpsnfg
tqytycnvdhkpntkvdktkverkcvecppcpappvagpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwy
vdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwlngkeykckvsnkglpapiektisktkgqprepqvylppsreemtk
nqvsltclvkgyfypsdiavewesngqpennykttppmlsdsgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqksl
slspgk

5 - SEQ ID NO 20: L-CDR1 de anticuerpo MOR-7361
SGDNIGSKYVS

- SEQ ID NO 21: L-CDR2 de anticuerpo MOR-7361
SDSERPS

10 - SEQ ID NO 22: L-CDR3 de anticuerpo MOR-7361
QSWDGSISRV

- SEQ ID NO 23: Secuencia de Aminoácidos de V_L de anticuerpo MOR-7361

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSKYVSWYQQKPGQAPVLVIYSDSERPSGIPE
RFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSWDGSISRVFGGGTKLTVL

- SEQ ID NO 24: Secuencia de Aminoácidos de Cadena Ligera de Longitud Completa de anticuerpo MOR-7361

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSKYVSWYQQKPGQAPVLVIYSDSERPSGIPE
RFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSWDGSISRVFGGGTKLTVLgqpkapsvtlfpp
sseeIqankatlvlclisdfypgavtvawkadsspvkagvettpskqsnkyaassylstpeqwkshrsyscqvthegst
vektvaptecs

15 - SEQ ID NO 25: Secuencia de Ácido Nucleico de V_H de anticuerpo MOR-7361

cagggtcaattgggtgaaagcggcggcggcctgggtcaaccggggcggcagcctgcgtctgagctgcgcggcctccgga
ttacctttctgattattatgcattgggtgcgccaagcccctgggaagggctcgcagtgagggtgagcgttatctctggttctggt
agcaatacctattatgcggatagcgtgaaaggccgtttaccatttcacgtgataattcgaaaaacacctgtatctgcaaat
gaacagcctgcgtgcggaagatacggccgtgattatgctgcgcgctcttatgctcagttgaggggtgattttggggccaag
gcaccctggtgacgggttagctca

- SEQ ID NO 26: Secuencia de Ácido Nucleico de V_L de anticuerpo MOR-7361

ES 2 699 648 T3

gatatcgaactgaccagccgccttcagtgagcgttgaccaggtcagaccgcgctatctcgtgtagcggcgataatatt
ggttctaagtagtttcttggtaccagcagaaacccgggcaggcgcagttctgtgatttctgattctgagcgtccctcag
gcatcccggaacgctttagcggatccaacagcggcaacaccgcgaccctgaccattagcggcactcaggcgggaagac
gaagcggattattattgccagctctgggatggttctatttctcgtgtgttggcggcggcacgaagtaaccgtcctaggtcag

- SEQ ID NO 27: Secuencia de Ácido Nucleico de Cadena Pesada de Longitud Completa de anticuerpo MOR-7361

caggtgcaattggtggaaagcggcggcggcctggtgcaaccgggcggcagcctgcgtctgagctgcgcgccctccgga
ttacctttctgattatataatgcaatgggtgcgccaagcccctgggaagggtctcgagtggtgagcgttatctcgttctggt
agcaatacctattatgcggtatgagcgtgaaaggccgtttaccatttcacgtgataattcgaaaaacaccctgtatctgcaaat
gaacagcctgcgtgcggaagatacggccgtgtattatgctgcgctctttagctcagttgaggggtgattttggggccaag
gcaccctggtgacggttagctcagcctccaccaagggccatcggcttccccctggcgcctgtcaccaggagcacctcc
gagagcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactactccccgaaccgggtgacggtgtcgtggaactcaggcgcctc
tgaccagcggcgtgcacacctccccggtgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtagtaccgtgcctc
cagcaactcggcaccagacctacacctgcaacgtatgatacaagcccagcaacaccaagggtggacaagacagttg
agcgcaaatggtgtgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagttctctctcccccaaac
ccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgcgtggtggacgtgagccacgaagaccccgagg
tccagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaagccacgggaggagcagttcaacagca
cgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggctccaac
aaaggcctcccagccccatcgagaaaccatctccaaaacaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccc
tgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctaccccagcgacat
cgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctccatgctggactccgacggct
ccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgttctctcatgctccgtgatgcatg
aggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

5 - SEQ ID NO 28: Secuencia de Ácido Nucleico de Cadena Ligera de Longitud Completa de anticuerpo MOR-7361

gatatcgaactgaccagccgccttcagtgagcgttgaccaggtcagaccgcgctatctcgtgtagcggcgataatatt
ggttctaagtagtttcttggtaccagcagaaacccgggcaggcgcagttctgtgatttctgattctgagcgtccctcag
gcatcccggaacgctttagcggatccaacagcggcaacaccgcgaccctgaccattagcggcactcaggcgggaagac
gaagcggattattattgccagctctgggatggttctatttctcgtgtgttggcggcggcacgaagtaaccgtcctaggtcag

- SEQ ID NO 29: H-CDR1 de anticuerpo MOR-7480; MOR-7480.1; MOR 7480.2; MOR-7483; MOR-7483.1; MOR-7483.2
STYWIS

10 - SEQ ID NO 30: H-CDR2 de anticuerpo MOR-7480; MOR-7480.1; MOR 7480.2; MOR-7483; MOR-7483.1; MOR-7483.2
KIYPGDSYTNYSFQ

- SEQ ID NO 31: H-CDR3 de anticuerpo MOR-7480; MOR-7480.1; MOR 7480.2; MOR-7483; MOR-7483.1; MOR-7483.2
15 RGYGIFDY

- SEQ ID NO 32: Secuencia de Aminoácidos de V_H de anticuerpo MOR-7480; MOR 7483

QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPGKGLEWMGKIYPGDSY
TNYSFSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYWCARGYGIFDYWGQGLTVTS
S

- SEQ ID NO 33: Secuencia de Aminoácidos de Cadena Pesada de Longitud Completa (IgG2) de anticuerpo MOR-7480; MOR 7483

QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPGKGLEWMGKIYPGDSY
TNYSFSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYWCARGYGIFDYWGQGLTVTS
Sastkgspsvflapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssgylsslsvvtvpsnfgtqytyc
nvdhkpsntkvdktkvercccvecppcpappvagpsvflfppkpkdtlmsrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgve
vhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwlngkeyckvsnkglpapiektisktkgqprepvytlppsreemtknqvslt
clvkgfypsdiavewesngqpennykttppmlsdsgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspg
k

5 - SEQ ID NO 34: L-CDR1 de anticuerpo MOR-7480; MOR-7480.1; MOR 7480.2; MOR-7483; MOR-7483.1; MOR-7483.2
SGDNIGDQYAH

10 - SEQ ID NO 35: L-CDR2 de anticuerpo MOR-7480; MOR-7480.1; MOR 7480.2; MOR-7483; MOR-7483.1; MOR-7483.2
QDKNRPS

- SEQ ID NO 36: L-CDR3 de anticuerpo MOR-7480; MOR-7480.1; MOR 7480.2
ATYTGFGSLAV

- SEQ ID NO 37: Secuencia de Aminoácidos de V_L de anticuerpo MOR-7480

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQAPVVIYQDKNRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCATYTGFGSLAVFGGGTKLTVL

15 - SEQ ID NO 38: Secuencia de Aminoácidos de Cadena Ligera de Longitud Completa de anticuerpo MOR-7480

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQAPVVIYQDKNRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCATYTGFGSLAVFGGGTKLTVLgqpkapsvtlf
ppsseelqankatlvcilsdfypgavtvawkadsspvkagvettpskqsnkyaassyilstpeqwkshrsyscqvthe
gstvektvaptcs

- SEQ ID NO 39: Secuencia de Ácido Nucleico de V_H de anticuerpo MOR-7480; MOR-7483

cagggtgcaattggttcagagcggcgcggaagtgaaaaaaccggcgaaagcctgaaaattagctgcaaaggttcggg
atattccttttctacttattggatttctgggtgcgccagatgcctgggaagggtctcgagtggatgggcaagatctatccgggt
gatagctataccaattattctccagacttcagggccaggtgactattagcgcggataaaagcattagcaccgcgtatctca
atggagcagcctgaaagcgagcgatagcggccatgtattattgtgcgcgtgggtatggtattttgattatggggccaaggca
ccctggtcaccgtctctca

- SEQ ID NO 40: Secuencia de Ácido Nucleico de V_L de anticuerpo MOR-7480

20 Gatatogaactgaccagccgcttcagtgagcgttgaccaggtcagaccgcgctatctcgtagcggcgataatatt
ggtgatcagtagctcattggtaccagcagaaaccggcgaggcagcaggtgtgtgattatcaggataagaatcgtccct

caggcatcccggaacgctttagcggatccaacagcggcaacaccgcgaccctgaccattagcggcactcaggcggaa
gacgaagcggattattattgcgctactatactggtttggttctctgctgtgtttggcggcgccacgaagtaaccgtccta

- SEQ ID NO 41: Secuencia de Ácido Nucleico de Cadena Pesada de Longitud Completa (IgG2) de anticuerpo MOR-7480; MOR-7483

cagggtcaattggttcagagcggcgcggaagtgaaaaaccgggcaagcctgaaaattagctgcaaaggttccgg
atattccttttctacttattggatttctgggtgcgccagatgcctgggaagggtctcgagtggatgggaagatctatccgggt
gatagctataccaattattctccgagctttcagggccaggtgactattagcgcggataaaagcattagcaccgcgtatctca
atgggagcagcctgaaagcgcgagcgtatcggccatgtattattgtgcgctggttatggtattttgattattggggccaaggca
ccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggccatcggctctccccctggcgcctgctccaggagcacctccgaga
gcacagcggccctgggctgcctgtcaaggactactccccgaaccgggtgacgggtgctggaactcaggcgcctctgacc
agcggcgtgcacaccttcccggtgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtagtaccgtgccctccagc
aacttcggcaccagacctacacctgcaacgtagatcacaagccagcaacaccaagggtggacaagacagttgagcg
caaattgtgtgtagtgccaccgtgccagcaccacctgtggcaggaccgtcagcttctcttcccccaaaaacccaa
ggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacgtgcgtggtggacgtgagccacgaagaccccgaggtcca
gttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacggt
ccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtcaaggtctccaacaaa
ggcctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccc
cccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgc
cgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctccatgctggactccgacggctcctt
cttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgagg
ctctgcacaaccactacacacagaagagcctctcctgtctccgggtaaa

5 - SEQ ID NO 42: Secuencia de Ácido Nucleico de Cadena Ligera de Longitud Completa del anticuerpo MOR-7480

gatatcgaactgaccagccgcttctcagtgagcgttgaccagggtcagaccgcgctatctcgtgtagcggcgataatatt
ggtgatcagatgctcattggtaccagcagaaaccgggcaggcgcagttgttgattatcaggataagaatcgtccct
caggcatcccggaacgctttagcggatccaacagcggcaacaccgcgaccctgaccattagcggcactcaggcggaa
gacgaagcggattattattgcgctactatactggtttggttctctgctgtgtttggcggcgccacgaagtaaccgtccta

- SEQ ID NO 43: Secuencia de Aminoácidos de V_H de anticuerpo MOR-7480.1; MOR-7480.2; MOR-7483.1; MOR-7483.2

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPGKGLEWMGKIYPGDSY
TNYSFSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGTLVTVS
S

10 - SEQ ID NO 44: Secuencia de Aminoácidos de Cadena Pesada de Longitud Completa (IgG2) de anticuerpo MOR-7480.1; MOR-7480.2; MOR-7483.1; MOR-7483.2

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPGKGLEWMGKIYPGDSY
TNYSFSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGLTVTS
Sastkgpsvfplapcsrstsestaalgclvkdyfepvvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssnfgtqytyc
nvdhkpsntkvdktkvercccvecppcpappvagpsvflfpkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevfqnwyvdgve
vhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwlngkeykckvsnkglpapiektisktkgqprepvytlppsreemtknqvslt
clvkgfypsdiavewesngqpennykttppmlsdsgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsisp
k

- SEQ ID NO 45: Secuencia de Aminoácidos de V_L de anticuerpo MOR-7480.1

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVLVIYQDKNRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCATYTGFGSLAVFGGGTKLTVL

- SEQ ID NO 46: Secuencia de Aminoácidos de Cadena Ligera de Longitud Completa de anticuerpo MOR-7480.1

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVLVIYQDKNRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCATYTGFGSLAVFGGGTKLTVLgqpkapsvtlf
ppsseelqankatlvlclisdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnkyaassyltpeqwkshrsycqvthe
gstvektvaptecs

5

- SEQ ID NO 47: Secuencia de Ácido Nucleico de V_H de anticuerpo MOR-7480.1; MOR-7480.2; MOR-7483.1; MOR-7483.2

gaggtgcaattgggtcagagcggcgcggaagtgaaaaaccggggaagcctgaggattagctgcaaaggtccgg
atattcctttctacttattggatttctgggtgcgccagatgcctgggaagggctcagtgatgggcaagatctatccgggt
gatagctataccaattattctccgagcttcagggccaggtgactattagcgcggataaaagcattagcaccgcgtatctca
atggagcagcctgaaagcgagcgatcgccatgtattattgtgcgcgtggttatggtattttgattattggggccaaggca
ccctggtcaccgtctcctca

- SEQ ID NO 48: Secuencia de Ácido Nucleico de V_L de anticuerpo MOR-7480.1

agctacgagctgaccagccccagcgtgtccgtgagccctggccagaccgccagcatcacctgcagcggcgacaa
catcggcgaccagtagcggcactggtatcagcagaagcccggccagagccccgtgctggtgatctaccaggacaaga
accggcccagcggcatccccgagcgggtcagcggcagcaacagcggcaacaccgccaccctgaccatcagcggcac
ccaggccatggacgaggccgactactactgcgccacctacaccggcttcggcagcctggccgtggtcggcgaggggac
caagctgaccgtccta

10

- SEQ ID NO 49: Secuencia de Ácido Nucleico de Cadena Pesada de Longitud Completa (IgG2) de anticuerpo MOR-7480.1; MOR-7480.2; MOR-7483.1; MOR-7483.2

gagggtgcaattgggtcagagcggcgcggaagtgaaaaaccgggcgaaagcctgaggattagctgcaaagggtccgg
 atattcctttctacttattggattcttgggtgcccagatgcttgggaagggtctcgagtggatgggcaagatctatccgggt
 gatagctataccaattattctccgagcttccagggccaggtgactattagcgcggataaaagcattagcaccgcgtatctca
 atgggagcagcctgaaagcgagcgatacggccatgtattattgtgocggtgggtatggatffffgattatggggccaaggca
 ccttggtcaccgtctctcagcctccaccaagggccatcgggtctccccctggcgccctgctccaggagcacctccgaga
 gcacagcggccctgggctgcctggcaaggactactccccgaaccgggtgacgggtgctggaactcaggcgctctgacc
 agcggcgtgcacaccttcccggctgtctacagctctcaggactctactccctcagcagcgtagtaccgtgccctccagc
 aactcggcaccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagacagttgagcg
 caaatgttgtgctgagtgcccaccgtgccagcaccacctgtggcaggaccgtcagcttctcttcccccaaaacccaa
 ggacacctcatgatctccggacctctgaggtcacgtgcgtgggtgggacgtgagccacgaagaccccgagggtcca
 gttcaactggtagctggagcggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgtt
 ccgtgtggtagcgtctcaccgtcgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggctccaacaaa
 ggctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaaggcgagccccgagaaccacaggtgtacacctgccc
 cccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgc
 cgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctccatgctggactccgacggctcctt
 ctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgttctctcatgctccgtgatgatgagg
 ctctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

- SEQ ID NO 50: Secuencia de Ácido Nucleico de Cadena Ligera de Longitud Completa de anticuerpo MOR-7480.1

agctacgagctgacctagccccagcgtgtccgtgagccctggccagaccgccagcatcacctgcagcggcgacaa
 catcggcgaccagtagccccactggatcagcagaagcccggccagagccccgtgctggtgatctaccaggacaaga
 accggcccagcggcatccccgagcgggtcagcggcagcaacagcggcaacaccgccacctgacctcagcggcac
 ccaggccatggacgaggccgactactctgcgccacctacaccggcttcggcagcctggccgtgttcggcggagggac
 caagctgacctcctaggtcagcccaaggctccccctcggtcactctgttcccacctctctgaggagctcaagccaa
 caaggccacactgggtgtctcataagtgacttctacccgggagccgtgacagtgccctggaaggcagatagcagcccc
 gtcaaggcgggagtgagaccaccacacctccaacaaagcaacaacaagtacgcggccagcagctacctgagc
 ctgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaaggggagcaccgtggagaaga
 cagtggcccctacagaatgttca

5

- SEQ ID NO 51: Secuencia de Aminoácidos de VL de anticuerpo MOR-7480.2

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVVVIYQDKNRPSGIP
 ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCATYTGFGSLAVFGGGTKLTVL

- SEQ ID NO 52: Secuencia de Aminoácidos de Cadena Ligera de Longitud Completa de anticuerpo MOR-7480.2

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVVVIYQDKNRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCCATYTGFGSLAVFGGGTKLTVLgqpkaapsvtlf
ppsseelqankatlvlclisdfypgavtvawkadsspvkagvetttskqsnkyaassylstpeqwkshrsyscqvtthe
gstvektvaptecs

- SEQ ID NO 53: Secuencia de Ácido Nucleico de V_L de anticuerpo MOR-7480.2

agctacgagctgaccagccccagcgtgtccgtgagccctggccagaccgccagcatcacctgcagcggcgacaa
catcggcgaccagtagcccactggatcagcagaagcccggccagagccccgtggtggtgatctaccaggacaaga
accggcccagcggcatccccgagcgggtcagcggcagcaacagcggcaacaccgccaccctgaccatcagcggcac
ccaggccatggacgaggccgactactactgcgccacctacaccggcttcggcagcctggccgtgttcggcggagggac
caagctgaccgtccta

- 5 - SEQ ID NO 54: Secuencia de Ácido Nucleico de Cadena Ligera de Longitud Completa de anticuerpo MOR-7480.2

agctacgagctgaccagccccagcgtgtccgtgagccctggccagaccgccagcatcacctgcagcggcgacaa
catcggcgaccagtagcccactggatcagcagaagcccggccagagccccgtggtggtgatctaccaggacaaga
accggcccagcggcatccccgagcgggtcagcggcagcaacagcggcaacaccgccaccctgaccatcagcggcac
ccaggccatggacgaggccgactactactgcgccacctacaccggcttcggcagcctggccgtgttcggcggagggac
caagctgaccgtcctaggtcagcccaaggctgccccctcggctactctgttcccaccctcctctgaggagctcaagccaa
caaggccacactggtgtgtctcataagtgacttctaccgggagccgtgacagtgccctggaaggcagatagcagcccc
gtcaaggcgggagtgagaccaccacaccctccaaacaagcaacaacaagtagcggccagcagctacctgagc
ctgagcctgagcagtggaagtccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaaggagcaccgtggagaaga
cagtgggcccctacagaatgttca

- SEQ ID NO 55: L-CDR3 de anticuerpo MOR-7483; MOR-7483.1; MOR-7483.2
STYTFVGFTTV

- SEQ ID NO 56: Secuencia de Aminoácidos de V_L de anticuerpo MOR-7483

10 DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQAPVVVIYQDKNRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSTYTFVGFTTVFGGGTKLTVL

- SEQ ID NO 57: Secuencia de Aminoácidos de Cadena Ligera de Longitud Completa de anticuerpo MOR-7483

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQAPVVVIYQDKNRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSTYTFVGFTTVFGGGTKLTVLgqpkaapsvtlf
ppsseelqankatlvlclisdfypgavtvawkadsspvkagvetttskqsnkyaassylstpeqwkshrsyscqvtthe
gstvektvaptecs

- SEQ ID NO 58: Secuencia de Ácido Nucleico de V_L de anticuerpo MOR-7483

Gatatcgaactgaccagccgccttcagtgagcgttgaccaggtcagaccgcgctatctcgtgtagcggcgataatatt
ggatgatcagatgctcattggtaccagcagaaaccggggcaggcgccagttggtgattatcaggataagaatcgtccct
caggcatcccgggaacgctttagcggatccaacagcggcaacaccgcgaccctgaccattagcggcactcaggcggaa
gacgaagcggattattatgctctacttatacttttggttttactactgtgtttggcggcggcacgaagtaaccgtccta

- SEQ ID NO 59: Secuencia de Ácido Nucleico de Cadena Ligera de Longitud Completa de anticuerpo MOR-7483

Gatatcgaactgaccagccgccttcagtgagcgttgaccaggtcagaccgcgctatctcgtgtagcggcgataatatt
ggatgatcagatgctcattggtaccagcagaaaccggggcaggcgccagttggtgattatcaggataagaatcgtccct
caggcatcccgggaacgctttagcggatccaacagcggcaacaccgcgaccctgaccattagcggcactcaggcggaa
gacgaagcggattattatgctctacttatacttttggttttactactgtgtttggcggcggcacgaagtaaccgtcctaggtc
agcccaaggctccccctcggcactctgttcccaccctctctgaggagctcaagccaacaaggccacactggtgtgtct
cataagtactctaccgggagccgtgacagtgccctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggagtgaggaga
ccaccacaccctccaaacaaagcaacaacaagtacgcgccagcagctacctgagcctgacgctgagcagtgaggaa
gtcccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaagggagcaccgtggagaagacagtgggccctacagaatgttc
a

- SEQ ID NO 60: Secuencia de Aminoácidos de V_L de anticuerpo MOR-7483.1

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVLVIYQDKNRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCSTYTFVGFTTVFGGGTKLTVL

5

- SEQ ID NO 61: Secuencia de Aminoácidos de Cadena Ligera de Longitud Completa de anticuerpo MOR-7483.1

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVLVIYQDKNRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCSTYTFVGFTTVFGGGTKLTVLgqpkaapsvtlf
ppsseelqankatlvcldisdfypgavtvawkadsspvkagvettpskqsnnkyaassylsltpeqwkshrsyscqvtthe
gstvektvaptecs

- SEQ ID NO 62: Secuencia de Ácido Nucleico de V_L de anticuerpo MOR-7483.1

Agctacgagctgaccagccccccagcgtgtccgtgagccctggccagaccgccagcatcacctgacgcgcgacaa
catcggcgaccagtagcggcactggatcagcagaagcccggccagagccccgtgctggtgatctaccaggacaaga
accggcccagcggcatccccgagcggttcagcggcagcaacagcggcaacaccgccaccctgaccatcagcggcac
ccaggccatggacgaggccgactactactgctctacttatacttttggttttactactgtgttcggcgggagggaccaagct
gaccgtccta

- 10 - SEQ ID NO 63: Secuencia de Ácido Nucleico de Cadena Ligera de Longitud Completa de anticuerpo MOR-7483.1

agctacgagctgacctagccccccagcgtgtccgtgagccctggccagaccgccagcatcacctgcagcggcgacaa
catcggcgaccagctacgcccactggatcagcagaagcccggccagagccccgtggtgatctaccaggacaaga
accggcccagcggcatccccgagcgggtcagcggcagcaacagcggcaacaccgccaccctgacctcagcggcac
ccaggccatggacgaggccgactactactgtctacttatacttttggttttactactgtgttcggcggagggaccaagct
gaccgtcctaggtcagcccaaggctgccccctcggctactctgttcccaccctcctctgaggagctcaagccaacaaggc
cacactgggtgtctcataagtgacttctaccgggagccgtgacagtgccctggaaggcagatagcagccccgtcaagg
cgggagtgaggaccaccacaccctccaaacaaagcaacaacaagtacggccagcagctacctgagcctgacgcc
tgagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaaggagcaccgtggagaagacagtgggc
cctacagaatgttca

- SEQ ID NO 64: Secuencia de Aminoácidos de V_L de anticuerpo MOR-7483.2

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVVVIYQDKNRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCSTYTFVGF~~TTV~~FGGGTKLTVL

- SEQ ID NO 65: Secuencia de Aminoácidos de Cadena Ligera de Longitud Completa de anticuerpo MOR-7483.2

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVVVIYQDKNRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCSTYTFVGF~~TTV~~FGGGTKLTVLgqpkaapsvtlf
ppsseelqankatlvlclisdfypgavtvawkadsspvkagvettpskqsnkyaassylsltpeqwkshrsyscqvthe
gstvektvaptecs

5

- SEQ ID NO 66: Secuencia de Ácido Nucleico de V_L de anticuerpo MOR-7483.2

agctacgagctgacctagccccccagcgtgtccgtgagccctggccagaccgccagcatcacctgcagcggcgacaa
catcggcgaccagctacgcccactggatcagcagaagcccggccagagccccgtggtgatctaccaggacaaga
accggcccagcggcatccccgagcgggtcagcggcagcaacagcggcaacaccgccaccctgacctcagcggcac
ccaggccatggacgaggccgactactactgtctacttatacttttggttttactactgtgttcggcggagggaccaagct
gaccgtccta

- SEQ ID NO 67: Secuencia de Ácido Nucleico de Cadena Ligera de Longitud Completa de anticuerpo MOR-7483.2

agctacgagctgacctagccccccagcgtgtccgtgagccctggccagaccgccagcatcacctgcagcggcgacaa
catcggcgaccagctacgcccactggatcagcagaagcccggccagagccccgtggtgatctaccaggacaaga
accggcccagcggcatccccgagcgggtcagcggcagcaacagcggcaacaccgccaccctgacctcagcggcac
ccaggccatggacgaggccgactactactgtctacttatacttttggttttactactgtgttcggcggagggaccaagct
gaccgtcctaggtcagcccaaggctgccccctcggctactctgttcccaccctcctctgaggagctcaagccaacaaggc
cacactgggtgtctcataagtgacttctaccgggagccgtgacagtgccctggaaggcagatagcagccccgtcaagg
cgggagtgaggaccaccacaccctccaaacaaagcaacaacaagtacggccagcagctacctgagcctgacgcc
tgagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaaggagcaccgtggagaagacagtgggc
cctacagaatgttca

10

- SEQ ID NO 68: Secuencia de Aminoácidos de 4-1BB Humano

mgnsycynivatlllvInfertrslqdpncpagnfcdnrrnqicspcppnsfssaggqrtdicrqckgvfrtrkecsstnae
cdctpgfhclgagcsmceqdckqggeltkkkgckdccfgtfndqkrgicrpwtncsldgksvlngtkerdvvcgppadls
pgassvtpaparepghspqiisfflaltstallfflfltrfsvvkrgrklllyifkqpfmrpvqtqeedgcscrfeeeeeggcel

- SEQ ID NO 69: Secuencia de Aminoácidos de Región Constante de IgG1 Humana

astkgpsvflapsskstsggtaalgclvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavllqssglyslssvvtvpssslgtqtyicn
vnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccppcpapellggpsvflfppkpkdltlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg
vevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqpprepqvylppsreemtknq
vsltclvkgfypsdiavewesngqpennyktppvlidsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsls
pgk

- SEQ ID NO 70: Secuencia de Ácido Nucleico de Región Constante de IgG1 Humana

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT
CTGGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG
TGACGGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG
CTGTCTACAGTCCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCC
AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACA
CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCA
CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCCAA
AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT
GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG
GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC
GTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA
AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG
AGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAA
GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCA
CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA
5 TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

- SEQ ID NO 71: Secuencia de Aminoácidos de Región Constante de IgG2 Humana

astkgpsvflapcsrstsestaalgclvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavllqssglyslssvvtvpssnfgtqtytcnv
dhkpsntkvdktverkccvecppcpappvagpsvflfppkpkdltlmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevh
naktkpreeqfnstfrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglpapiektisktkgqpprepqvylppsreemtknqvsltcl
vkgfypsdiavewesngqpennyktppmlidsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsispk

- SEQ ID NO 72: Secuencia de Ácido Nucleico de Región Constante de IgG2 Humana

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCT
 CCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG
 TGACGGTGTTCGTGGAAGTCAAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGG
 CTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCC
 AGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACA
 CCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGCGAGTGCCCACCGTGCCC
 AGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC
 ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCC
 ACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
 TGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGC
 GTCCTCACCGTCGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
 TCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGG
 CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC
 AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCG
 CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTC
 CCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
 GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
 CACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA

- SEQ ID NO 73: Secuencia de Aminoácidos de Región Constante de Cadena Ligera Lambda Humana
 gqpk aapsv lfp psseelq ankatl vclisdfy p g avt vaw k adsspvk agvett pskqsn nky a assyl sltpeqwks
 hrsyscq vthe g stvektv aptecs

5 - SEQ ID NO 74: Secuencia de Ácido Nucleico de Región Constante de Cadena Ligera Lambda Humana
 GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCACCCTCCTCTGAGGAGC
 TTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGA CT TCTACCCGGGAGCC
 GTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACC
 ACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCC
 TGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGA
 AGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTCA

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Pfizer Inc.
- <120> MOLÉCULAS DE UNIÓN A 4-1BB
- 15 <130> PC33845A
- <160> 74
- <170> PatentIn versión 3.5
- 20 <210> 1

ES 2 699 648 T3

<211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 1

Asn Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

10 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Gly Ile Ile Pro Gly Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

15 Gly

20 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

Arg Lys Asn Glu Glu Asp Gly Gly Phe Asp His
1 5 10

25 <210> 4
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 4

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

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

ES 2 699 648 T3

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

Gly Gly Ile Ile Pro Gly Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Lys Asn Glu Glu Asp Gly Gly Phe Asp His Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 5

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Gly Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Lys Asn Glu Glu Asp Gly Gly Phe Asp His Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

ES 2 699 648 T3

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

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

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

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

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala 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 His 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 Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

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

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

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

Arg 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

ES 2 699 648 T3

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

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

Gln 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 Pro Gly Lys
 435 440 445

5 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6
 Ser Gly Asp Asn Leu Gly Asp Tyr Tyr Ala Ser
 1 5 10

10 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 7
 Asp Asp Ser Asn Arg Pro Ser
 1 5

20 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 8
 Gln Thr Trp Asp Gly Thr Leu His Phe Val
 1 5 10

30 <210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 9
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Leu Gly Asp Tyr Tyr Ala

ES 2 699 648 T3

20 25 30

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

Asp Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Trp Asp Gly Thr Leu His Phe
85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 10
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10

5

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Leu Gly Asp Tyr Tyr Ala
20 25 30

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

Asp Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Trp Asp Gly Thr Leu His Phe
85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala
115 120 125

Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala
130 135 140

Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val
145 150 155 160

Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser
165 170 175

Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr
180 185 190

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

Pro Thr Glu Cys Ser
210

10

ES 2 699 648 T3

<210> 11
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 11
 caggtgcaat tggttcagtc tggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcagcag cgtgaaagtg 60
 agctgcaaag cctccggagg cacttttaat tcttatgcta tttcttgggt gcgccaagcc 120
 cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcggt atcattccgg gttttggcac tgcgaattac 180
 gcgcagaagt ttcagggccg ggtgaccatt accgcggatg aaagcaccag caccgcgtat 240
 atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtaagaat 300
 gaggaggatg gtggttttga tcattggggc caaggcacc ccaaggcacc tggtgacggt tagctca 357
 10
 <210> 12
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 12
 gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgcaac caggtcagac cgcgcgtatc 60
 tcgtgtagcg gcgataatct tggtgattat tatgcttctt ggtaccagca gaaaccggg 120
 caggcgcag ttcttgtgat ttatgatgat totaatcgtc cctcaggcat cccggaacgc 180
 ttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac tcaggcggaa 240
 gacgaagcgg attattattg ccagacttgg gatggtactc ttcattttgt gtttggcggc 300
 ggcacgaagt taaccgttct t 321
 20
 <210> 13
 <211> 1335
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 13

ES 2 699 648 T3

caggtgcaat tggttcagtc tggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcagcag cgtgaaagtg 60
 agctgcaaag cctcoggagg cacttttaat tcttatgcta tttcttgggt gcgccaagcc 120
 cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcggg atcattccgg gttttggcac tgccaattac 180
 gcgcagaagt ttcagggccg ggtgaccatt accgcggatg aaagcaccag caccgcgtat 240
 atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgccc gcgtaagaat 300
 gaggaggatg gtggttttga tcattggggc caaggcaccc tggtgacggt tagctcagcc 360
 tccaccaagg gcccatcggg ctccccctg gggccctgct ccaggagcac ctccgagagc 420
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcagggc ctctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 540
 ctctactccc tcagcagcgt agtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac 600
 acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaagggtg acaagacagt tgagcgcaaa 660
 tgttgtgtcg agtgccacc gtgccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc 720
 ttcccccaa aaccoaagga caccctcatg atctcccgga ccctgaggt cacgtgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccacga agaccccag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc agccccatc gagaaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1020
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccctccggg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggctc tactccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1200
 tctttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctccgg gtaaa 1335

<210> 14
 <211> 639
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

gatatogaac tgaccagacc gccttcagtg agcgttgca caggtcagac cgcgcgtatc 60
 tcgtgtagcg gcgataatct tggtgattat tatgcttctt ggtaccagca gaaaccggg 120
 caggcgcag ttcttgtgat ttatgatgat tctaactcgtc cctcaggcat cccggaacgc 180

5

10

ES 2 699 648 T3

tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac tcaggcggaa 240
gacgaagcgg attattattg ccagacttgg gatggtactc ttcattttgt gtttgggcgg 300
ggcacgaagt taaccgttct tggtcagccc aagggtgcc cctcggtcac tctgttccca 360
ccctcctctg aggagcttca agccaacaag gccacactgg tgtgtctcat aagtgacttc 420
taccggggag cegtgacagt ggcctggaag gcagatagca gccccgtcaa ggcgggagtg 480
gagaccacca cacctccaa acaaagcaac aacaagtacg cggccagcag ctacctgagc 540
ctgacgcctg agcagtggaa gtcccacaga agctacagct gccaggtcac gcatgaaggg 600
agcaccgtgg agaagacagt ggcccctaca gaatgttca 639

5 <210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

10 Ser Asp Tyr Tyr Met His
1 5

15 <210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Val Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

20 Gly

25 <210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Arg Leu Tyr Ala Gln Phe Glu Gly Asp Phe
1 5 10

30 <210> 18
<211> 118
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 18

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

ES 2 699 648 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 19
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 19

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

10

ES 2 699 648 T3

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

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240

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

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

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

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300

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

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

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

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

ES 2 699 648 T3

355

360

365

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 20

Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

Ser Asp Ser Glu Arg Pro Ser
1 5

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 22

Gln Ser Trp Asp Gly Ser Ile Ser Arg Val
1 5 10

<210> 23
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 23

ES 2 699 648 T3

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

<210> 24
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 24

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

10

ES 2 699 648 T3

Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala
 115 120 125

Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala
 130 135 140

Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val
 145 150 155 160

Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser
 165 170 175

Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr
 180 185 190

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

Pro Thr Glu Cys Ser
 210

5 <210> 25
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg 60

agctgocgcg cctcoggatt taccttttct gattattata tgcattgggt gcgccaagcc 120

cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtt atctctggtt ctggtagcaa tacctattat 180

gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggcctgtg attattgcgc gcgtctttat 300

10 gctcagtttg aggggtgattt ttggggccaa ggcaccctgg tgacggttag ctca 354

15 <210> 26
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 26

gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcgtatc 60

tcgtgtagcg gcgataatat tggttctaag tatgtttctt ggtaccagca gaaaccoggg 120

cagggcggcag ttcttgatgat ttattctgat tctgagcgtc cctcaggcat cccggaacgc 180

tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac tcaggcggaa 240

gacgaagcgg attattattg ccagtcttgg gatggttcta tttctcgtgt gtttgccggc 300

20 ggcacgaagt taaccgtcct aggtcag 327

ES 2 699 648 T3

<210> 27
 <211> 1332
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 27

```

cagggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg      60
agctgcgcgg cctccggatt taccttttct gattattata tgcatgggt gcgccaagcc      120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtt atctctggtt ctggtagcaa tacctattat      180
gcggatagcg tgaaagccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgctc gcgtctttat      300
gctcagtttg agggtgattt ttggggccaa ggcaccctgg tgacggttag ctcagcctcc      360
accaagggcc catcggtctt cccctggcg cctgctcca ggagcacctc cgagagcaca      420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac      480
tcaggcgcctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccgctg tcctacagtc ctcaggactc      540
tactccctca gcagcgtagt gaccgtgcc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc      600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agacagttga gcgcaaatgt      660
tgtgtcagtg gccaccgtg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt ctctctctc      720
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg      780
gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag      840
gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacggt cctgtgtggtc      900
agegtcctca cegtctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc      960
tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaccacaa agggcagccc     1020
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc     1080
agcctgacct gcctggtcaa aggtctctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc     1140
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctccca tgctggactc cgacggctcc     1200
ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc     1260
tcatgctcog tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg     1320
tctccgggta aa                                                                1332
    
```

10

<210> 28
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 28

```

gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcgtatc      60
    
```

ES 2 699 648 T3

tcgtgtagcg gcgataatat tggttctaag tatgtttctt ggtaccagca gaaaccgagg 120
 caggcgccag ttcttgtgat ttattctgat tctgagcgtc cctcaggcat cccggaacgc 180
 tttagcggat ccaacagcgg caacaccggg accctgacca ttagcggcac tcaggcggaa 240
 gacgaagcgg attattattg ccagtccttg gatggttcta tttctcgtgt gtttggcggc 300
 ggcacgaagt taaccgtcct aggtcag 327

5 <210> 29
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 29

10 Ser Thr Tyr Trp Ile Ser
 1 5

15 <210> 30
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 30

Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

20 Gly
 <210> 31
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 31

30 Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr
 1 5

35 <210> 32
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 32

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

ES 2 699 648 T3

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

Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 33
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 33

5

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

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

10

ES 2 699 648 T3

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

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

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

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

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

Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
 290 295 300

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

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365

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

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

5 <210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 34

10 Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala His
 1 5 10

15 <210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 35

20 Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser
 1 5

25 <210> 36
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 36

30 Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu Ala Val
 1 5 10

35 <210> 37
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 37

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala

ES 2 699 648 T3

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

<210> 39
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 39

ES 2 699 648 T3

caggtgcaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgaaag cctgaaaatt 60
 agctgcaaag gttcccgata ttccttttct acttattgga tttcttgggt gcgccagatg 120
 cotgggaagg gtctcgagtg gatgggcaag atctatccgg gtgatagcta taccaattat 180
 tctccgagct ttcaggcca ggtgactatt agcgcgata aaagcattag caccgcgtat 240
 cttcaatgga gcagcctgaa agcgagcgat acggccatgt attattgtgc gcgtggttat 300
 ggtatTTTTG attattgggg ccaaggcacc ctggtcaccg tctcctca 348

5 <210> 40
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 40

gatatcgaac tgaccagacc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcgtatc 60
 tctgtatagc gcgataatat tgggatcag tatgctcatt ggtaccagca gaaacccggg 120
 caggcgcagc ttgttggat ttatcaggat aagaatcgtc cctcaggcat cccggaacgc 180
 tttagcggat ccaacagcgg caacaccggc accctgacca ttagcggcac tcaggcggaa 240
 gacgaagcgg attattattg cgctacttat actggTTTTG gttctcttgc tgtgTTTGGC 300
 ggcgccacga agttaaccgt ccta 324

10 <210> 41
 <211> 1326
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

caggtgcaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgaaag cctgaaaatt 60
 agctgcaaag gttcccgata ttccttttct acttattgga tttcttgggt gcgccagatg 120
 cotgggaagg gtctcgagtg gatgggcaag atctatccgg gtgatagcta taccaattat 180
 tctccgagct ttcaggcca ggtgactatt agcgcgata aaagcattag caccgcgtat 240
 cttcaatgga gcagcctgaa agcgagcgat acggccatgt attattgtgc gcgtggttat 300
 ggtatTTTTG attattgggg ccaaggcacc ctggtcaccg tctcctcagc ctccaccaag 360
 ggcccatcgg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 420
 ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgtg gaactcaggc 480
 gctctgacca gcgcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtctcagg actctactcc 540
 ctcagcagcg tagtgaccgt gccctccagc aacttcggca cccagacctc cacctgcaac 600
 gtagatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagacag ttgagcgaat atgttgtgtc 660
 gagtgccac cgtgccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctc cttcccccca 720
 aaaccacaag acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcactgtcgt ggtggtgac 780
 gtgagccacg aagacccca ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 840
 aatgccaaag caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 900
 ctcaccgtcg tgaccagga ctggctgaa ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 960
 aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaa ccaaagggca gccccgagaa 1020
 ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1080
 acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcggcg tggagtggga gagcaatggg 1140
 cagcgggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctctctcttc 1200
 ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacct ctctctatgc 1260
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctccg 1320
 ggtaaa 1326

20 <210> 42
 <211> 324

ES 2 699 648 T3

<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 42

5

```

gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcgtatc      60
tcgtgtagcg gcgataatat tggatgatcag tatgctcatt ggtaccagca gaaacccggg    120
caggcgccag ttgttgtgat ttatcaggat aagaatcgtc cctcaggcat cccggaacgc    180
tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagecggac tcaggcggaa    240
gacgaagcgg attattattg cgctacttat actgggtttg gttctcttgc tgtgtttggc    300
ggcggcacga agttaaccgt ccta                                           324
    
```

<210> 43
<211> 116
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 43

15

```

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
              20              25              30

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

Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
          50              55              60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
              85              90              95

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

Thr Val Ser Ser
          115
    
```

<210> 44
<211> 442
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 44

25

```

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
          20              25              30

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

ES 2 699 648 T3

Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

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

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

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

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

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

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

Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val

ES 2 699 648 T3

290 295 300

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

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

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

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 45
<211> 108
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 45

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
20 25 30

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

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
85 90 95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

10

ES 2 699 648 T3

<210> 46
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 46

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
 20 25 30

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

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
 85 90 95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
 100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
 115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
 130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
 165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
 180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
 195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210

10 <210> 47
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 47

ES 2 699 648 T3

```

gaggtgcaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgaaaag cctgaggatt      60
agctgcaaag gttccggata ttccttttct acttattgga tttcttgggt gcgccagatg      120
cctgggaag gtctcagtg gatgggcaag atctatccgg gtgatagcta taccaattat      180
tctccgagct ttcagggcca ggtgactatt agcgcggata aaagcattag caccgcgtat      240
cttcaatgga gcagcctgaa agcgagcgat acggccatgt attattgtgc gcgtggttat      300
ggtatTTTTG attattgggg ccaaggcacc ctggtcaccg tctcctca      348
    
```

5 <210> 48
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 48

```

agctacgagc tgaccagacc ccccagcgtg tccgtgagcc ctggccagac cgcagcacc      60
acctgcagcg gcgacaacat cggcgaccag tacgcccact ggtatcagca gaagcccgcc      120
cagagccccg tgctgggtgat ctaccaggac aagaaccggc ccagcggcat ccccgagcgg      180
ttcagcggca gcaacagcgg caacaccgcc accctgacca tcagcggcac ccaggccatg      240
gacgagggcc actactactg cgcacacctac accggcttgg gcagcctggc cgtgttcggc      300
ggagggacca agctgaccgt ccta      324
    
```

10

<210> 49
 <211> 1326
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 49

```

gaggtgcaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgaaaag cctgaggatt      60
agctgcaaag gttccggata ttccttttct acttattgga tttcttgggt gcgccagatg      120
cctgggaag gtctcagtg gatgggcaag atctatccgg gtgatagcta taccaattat      180
tctccgagct ttcagggcca ggtgactatt agcgcggata aaagcattag caccgcgtat      240
cttcaatgga gcagcctgaa agcgagcgat acggccatgt attattgtgc gcgtggttat      300
ggtatTTTTG attattgggg ccaaggcacc ctggtcaccg tctcctcagc ctccaccaag      360
ggcccacatg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc      420
ctgggtctgc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc      480
gctctgacca ggggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc      540
ctcagcagcg tagtgaccgt gccctccagc aacttcggca ccagaccta cacctgcaac      600
gtagatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagacag ttgagcgcga atggtgtgtc      660
gagtgccac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctc ctcccccca      720
aaacccaagg acacctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac      780
gtgagccacg aagacccccg ggtccagttc aactggtagc tggacggcgt ggaggtgcat      840
aatgccaaaga caaagccacg ggagagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc      900
ctcaccgtcg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcga ggtctccaac      960
aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaagggca gccccgagaa      1020
ccacaggtgt acacctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg      1080
acctgctctg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcggcg tggagtggga gagcaatggg      1140
cagccggaga acaactacaa gaccacaect cccatgctgg actccgacgg ctctctcttc      1200
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc      1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctccg      1320
ggtaaa      1326
    
```

20

ES 2 699 648 T3

<210> 50
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 50

```

agctacgagc tgaccagcc cccagcgtg tccgtgagcc ctggccagac cgccagcacc      60
acctgcagcg ggcacaacat cggcgaccag tacgccact ggtatcagca gaagcccggc      120
cagagccccg tgctggtgat ctaccaggac aagaaccggc ccagcggcat ccccgagcgg      180
ttcagcggca gcaacagcgg caacaccgcc accctgacca tcagcggcac ccaggccatg      240
gacgagggcg actactactg cgccacctac accggcttcg gcagcctggc cgtgttcggc      300
ggagggacca agctgaccgt cctaggtcag cccaaggtg cccctcggc cactctgttc      360
ccaccctcct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tgggtgtgtct cataagtgac      420
ttctaccggg gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagccccgt caagcgggga      480
gtggagacca ccacaccctc caaacaagc aacaacaagt acgcccagc cagctacctg      540
agcctgacgc ctgagcagtg gaagtccac agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa      600
gggagcaccg tggagaagac agtggcccct acagaatggt ca                          642
    
```

10

<210> 51
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 51

```

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
          20           25           30

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

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50           55           60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65           70           75           80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
          85           90           95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100          105
    
```

<210> 52
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

ES 2 699 648 T3

<400> 52

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
20 25 30

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

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
85 90 95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

5 <210> 53
<211> 324
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

ES 2 699 648 T3

<400> 53

```

agctacgagc tgaccagcc cccagcgtg tccgtgagcc ctggccagac cgccagcatc      60
acctgcagcg gcgacaacat cggcgaccag tacgcccact ggtatcagca gaagcccggc     120
cagagccccg tgggtggtgat ctaccaggac aagaaccggc ccagcggcat ccccgagcgg     180
ttcagcggca gcaacagcgg caacaccgcc accctgacca tcagcggcac ccaggccatg     240
gacgaggccg actactactg cgccacctac accggcttcg gcagcctggc cgtgttcggc     300
ggagggacca agctgaccgt ccta                                             324

```

5 <210> 54
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 54

```

agctacgagc tgaccagcc cccagcgtg tccgtgagcc ctggccagac cgccagcatc      60
acctgcagcg gcgacaacat cggcgaccag tacgcccact ggtatcagca gaagcccggc     120
cagagccccg tgggtggtgat ctaccaggac aagaaccggc ccagcggcat ccccgagcgg     180
ttcagcggca gcaacagcgg caacaccgcc accctgacca tcagcggcac ccaggccatg     240
gacgaggccg actactactg cgccacctac accggcttcg gcagcctggc cgtgttcggc     300
ggagggacca agctgaccgt cctaggtcag cccaaggctg cccctcggc cactctgttc     360
ccacctcct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tgggtgtgtct cataagtgac     420
ttctaccggg gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagccccgt caagcgggga     480
gtggagacca ccacaccctc caaacaagc aacaacaagt acgcgccag cagctacctg     540
agcctgacgc ctgagcagtg gaagtccac agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa     600
gggagcaccg tggagaagac agtggcccct acagaatggt ca                          642

```

15 <210> 55
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 55

```

Ser Thr Tyr Thr Phe Val Gly Phe Thr Thr Val
1           5           10

```

25 <210> 56
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 56

ES 2 699 648 T3

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
 20 25 30

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

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80

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

Thr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 57
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 57

5

ES 2 699 648 T3

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

<210> 58
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 58

ES 2 699 648 T3

gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcgtatc 60
 tcgtgtagcg gcgataatat tggatgacag tatgctcatt ggtaccagca gaaaccggg 120
 caggcgccag ttgttgatg ttatcaggat aagaatcgtc cctcaggcat cccggaacgc 180
 ttagcggat ccaacagcgg caacaccgag accctgacca ttagcggcac tcaggcggaa 240
 gacgaagcgg attattattg ctctacttat acttttggtg gttttactac tgtgtttggc 300
 ggcggcacga agttaaccgt ccta 324

5 <210> 59
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 59

gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcgtatc 60
 tcgtgtagcg gcgataatat tggatgacag tatgctcatt ggtaccagca gaaaccggg 120
 caggcgccag ttgttgatg ttatcaggat aagaatcgtc cctcaggcat cccggaacgc 180
 ttagcggat ccaacagcgg caacaccgag accctgacca ttagcggcac tcaggcggaa 240
 gacgaagcgg attattattg ctctacttat acttttggtg gttttactac tgtgtttggc 300
 ggcggcacga agttaaccgt cctaggtcag cccaaggctg cccctcggg cactctgttc 360
 ccaccctcct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tgggtgtgtct cataagtac 420
 ttctaccgg gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagccccgt caaggcggga 480
 gtggagacca ccacaccctc caaacaagc aacaacaagt acgcggccag cagctacctg 540
 agcctgacgc ctgagcagtg gaagtccac agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa 600
 10 gggagcaccg tggagaagac agtggcccct acagaatggt ca 642

15 <210> 60
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 60

ES 2 699 648 T3

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

<210> 61
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 61

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

10

ES 2 699 648 T3

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
 115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
 130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
 165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
 180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
 195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210

5 <210> 62
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 62

agctacgagc tgaccagacc cccagcgtg tccgtgagcc ctggccagac cgccagcatc 60
 acctgcagcg gcgacaacat cggcgaccag tacgcccact ggtatcagca gaagcccggc 120
 cagagccccg tgctggtgat ctaccaggac aagaaccggc ccagcggcat ccccagcggg 180
 ttcagcggca gcaacagcgg caacaccgcc accctgacca tcagcggcac ccaggccatg 240
 gacgaggccg actactactg ctctacttat acttttgttg gttttactac tgtgttcggc 300
 10 ggagggacca agctgaccgt ccta 324

15 <210> 63
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 63

agctacgagc tgaccagacc cccagcgtg tccgtgagcc ctggccagac cgccagcatc 60
 acctgcagcg gcgacaacat cggcgaccag tacgcccact ggtatcagca gaagcccggc 120
 cagagccccg tgctggtgat ctaccaggac aagaaccggc ccagcggcat ccccagcggg 180
 ttcagcggca gcaacagcgg caacaccgcc accctgacca tcagcggcac ccaggccatg 240
 gacgaggccg actactactg ctctacttat acttttgttg gttttactac tgtgttcggc 300

ES 2 699 648 T3

```

ggagggacca agctgaccgt cctaggtcag cccaaggctg cccoctcggc cactctgttc      360
ccaccctcct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tgggtgtgtct cataagtgac      420
ttctaccggg gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagccccgt caaggcggga      480
gtggagacca ccacaccctc caaacaagc aacaacaagt acgcggccag cagctacctg      540
agcctgacgc ctgagcagtg gaagtcccac agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa      600
gggagcaccg tggagaagac agtggcccct acagaatggt ca                          642

```

<210> 64
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 64

```

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
          20           25           30

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

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50           55           60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65           70           75           80

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

Thr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100           105

```

10

<210> 65
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 65

ES 2 699 648 T3

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
 20 25 30

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

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

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

Thr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
 100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
 115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
 130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
 165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
 180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
 195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210

<210> 66
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 66

ES 2 699 648 T3

agctacgagc tgaccagacc cccagcgtg tccgtgagcc ctggccagac cgccagcatc 60
 acctgcagcg gcgacaacat cggcgaccag tacgcccact ggtatcagca gaagcccggc 120
 cagagccccg tgggtggtgat ctaccaggac aagaaccggc ccagcggcat ccccgagcgg 180
 ttcagcggca gcaacagcgg caacaccgcc acctgacca tcagcggcac ccaggccatg 240
 gacgaggccg actactactg ctctacttat acttttggtg gttttactac tgtgttcggc 300
 ggagggacca agctgaccgt ccta 324

5 <210> 67
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 67

agctacgagc tgaccagacc cccagcgtg tccgtgagcc ctggccagac cgccagcatc 60
 acctgcagcg gcgacaacat cggcgaccag tacgcccact ggtatcagca gaagcccggc 120
 cagagccccg tgggtggtgat ctaccaggac aagaaccggc ccagcggcat ccccgagcgg 180
 ttcagcggca gcaacagcgg caacaccgcc acctgacca tcagcggcac ccaggccatg 240
 gacgaggccg actactactg ctctacttat acttttggtg gttttactac tgtgttcggc 300
 ggagggacca agctgaccgt cctaggtcag cccaaggctg cccctcggc cactctgttc 360
 ccaccctcct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tgggtgtgtct cataagtgac 420
 ttctaccggg gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagcccgt caaggcggga 480
 gtggagacca ccacaccctc caaacaagc aacaacaagt acgcggccag cagctacctg 540
 agcctgagc ctgagcagtg gaagtcaccac agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa 600
 gggagcaccg tggagaagac agtggcccct acagaatggt ca 642

15 <210> 68
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 68

ES 2 699 648 T3

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
35 40 45

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

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
85 90 95

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
130 135 140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
195 200 205

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
210 215 220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
245 250 255

ES 2 699 648 T3

<210> 69
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 69

```

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

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

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50                               55                               60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65                               70                               75                               80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 699 648 T3

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

5 <210> 70
 <211> 990
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 70

```

gcctccacca agggcccac cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg      60
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg      120
tggaaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtctca      180
ggactctact ccctcagcag cgtagtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagagacc      240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc      300
aaatctgtg acaaaaactca cacatgccc cctgtcccag cacctgaact cctgggggga      360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcctgatctc ccggaccct      420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      480
tacgtggagc gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag      600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc      660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag      720
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc      780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccogtg      840
ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacia gacaggtgg      900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa cactacacg      960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa      990
    
```

10 <210> 71
 <211> 326
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 71

```

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
    
```

ES 2 699 648 T3

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

ES 2 699 648 T3

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

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

5 <210> 72
 <211> 978
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 72

```

gctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgcct gctccaggag cacctccgag      60
agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg    120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcggtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca    180
ggactctact ccctcagcag cgtagtgacc gtgcctcca gcaacttcgg caccagacc      240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc      300
aaatggtgtg tcgagtgcc accgtgcca gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc      360
ctcttcccc caaaaccaa ggacacctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc      420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc      480
gtggaggtgc ataatgcaa gacaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt      540
gtggtcagcg tcctcaccgt cgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc      600
aaggtctoca acaaaggcct ccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa aaccaaaggg      660
cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccoatccc gggaggagat gaccaagaac      720
caggtcagcc tgacctgct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg      780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac      840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac      900
gtcttctoat gctcogtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc      960
10  tcctgtctc cgggtaaa      978
    
```

15 <210> 73
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 73

ES 2 699 648 T3

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

<210> 74
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 74

5

ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact ctgttccac cctcctctga ggagcttcaa 60
 gccaaacaagg ccacactggt gtgtctcata agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg 120
 gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag gcgggagtgg agaccaccac accctcaaaa 180
 caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag 240
 tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300
 gccctacag aatgttca 318

10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, o parte de unión a antígeno del mismo, que se une a 4-1BB humano, en el que dicho anticuerpo, o parte de unión a antígeno comprende:
 - 5 (a) una H-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 29;
 - (b) una H-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 30;
 - (c) una H-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 31;
 - (d) una L-CDR1 como se expone en SEQ ID NO: 34;
 - (e) una L-CDR2 como se expone en SEQ ID NO: 35; y
 - (f) una L-CDR3 como se expone en SEQ ID NO: 36;
- 10 2. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicho anticuerpo, o parte de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de región V_H como se expone en SEQ ID NO: 43.
- 15 3. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicho anticuerpo, o parte de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de región V_L como se expone en SEQ ID NO: 45.
4. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos de región V_H como se expone en SEQ ID NO: 43 y una secuencia de aminoácidos de región V_L como se expone en SEQ ID NO: 45.
- 20 5. Un anticuerpo aislado que se une a 4-1BB humano, en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 44 y comprende adicionalmente una secuencia de aminoácidos de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 46, opcionalmente en el que el resto de lisina C-terminal de SEQ ID NO: 44 esté ausente.
6. El anticuerpo aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es una IgG2.
- 25 7. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o la composición farmacéutica de la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento del crecimiento celular anómalo en un sujeto.
- 30 9. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, o la composición farmacéutica, para el uso de la reivindicación 8, en el que, en el tratamiento, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, o la composición farmacéutica se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos o terapias adicionales.
10. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, o la composición farmacéutica, para el uso de la reivindicación 9, en el que el agente terapéutico adicional es un agente inmunoterapéutico.
- 35 11. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, o la composición farmacéutica, para el uso de la reivindicación 10, en el que el agente inmunoterapéutico es rituximab.
12. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
13. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 12.
14. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 13.
- 40

FIG. 1

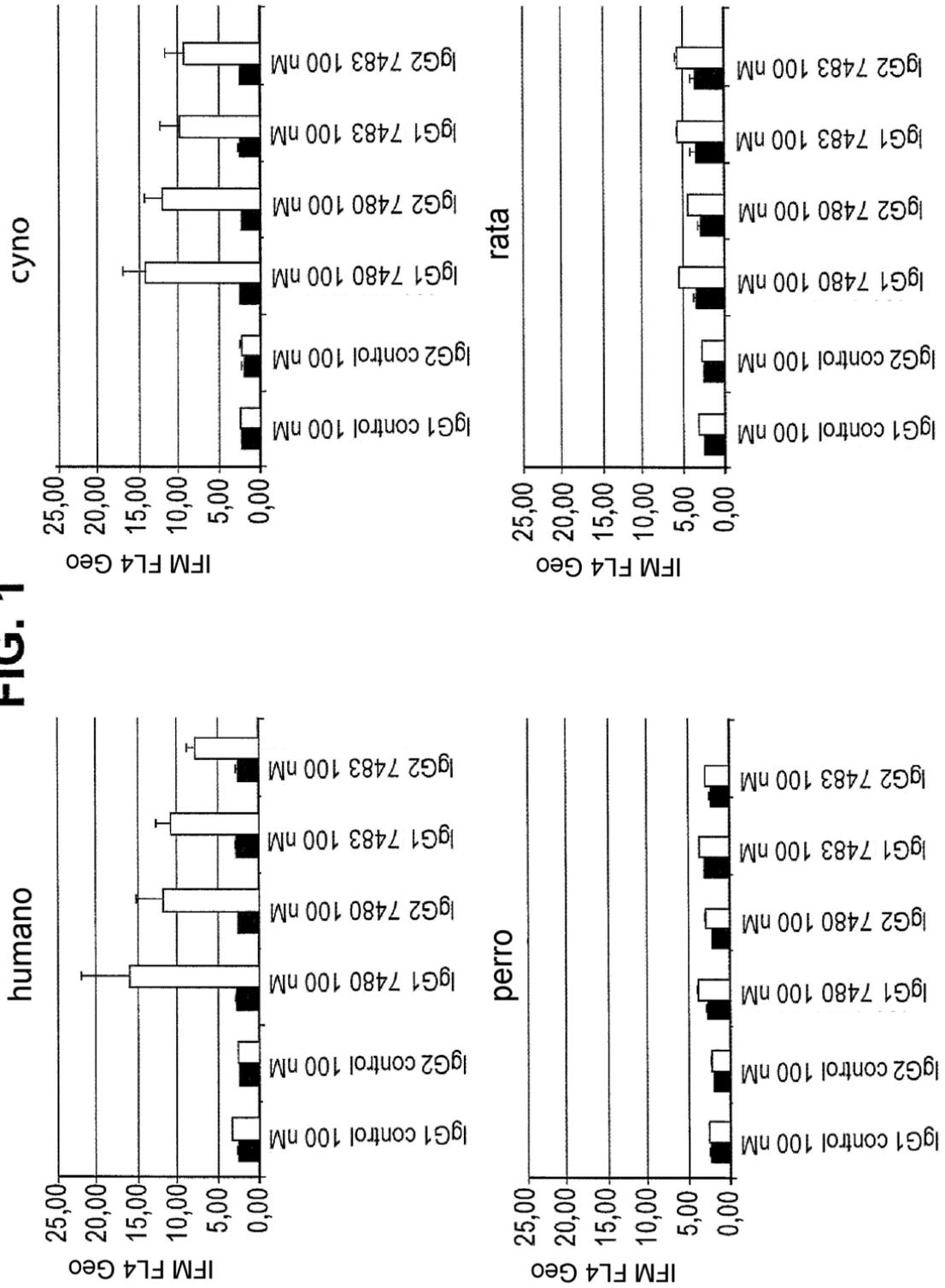


FIG. 2

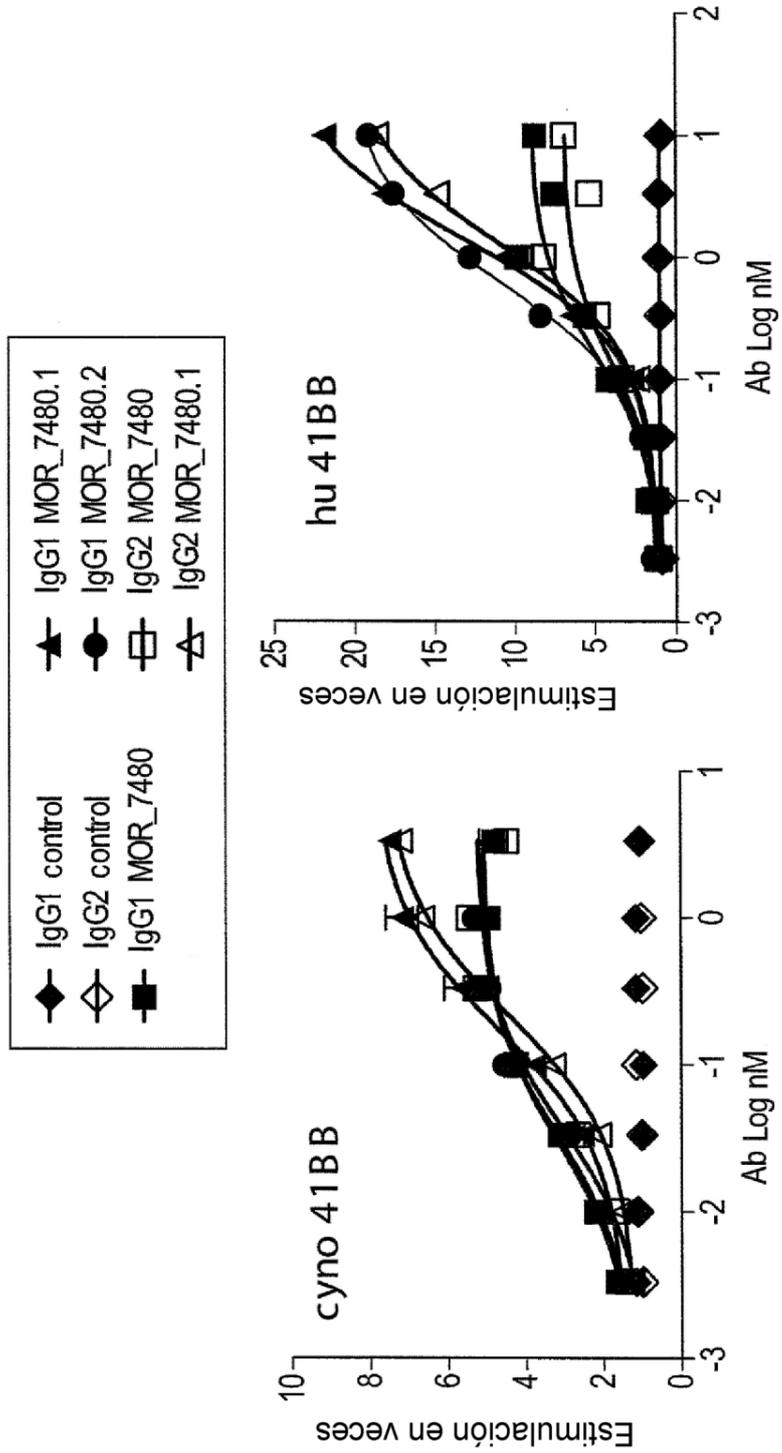


FIG. 3B

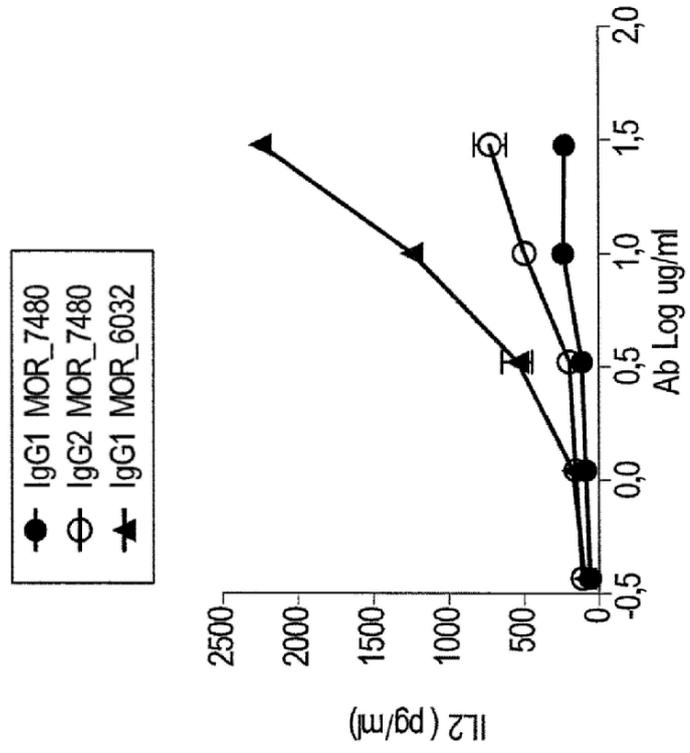


FIG. 3A

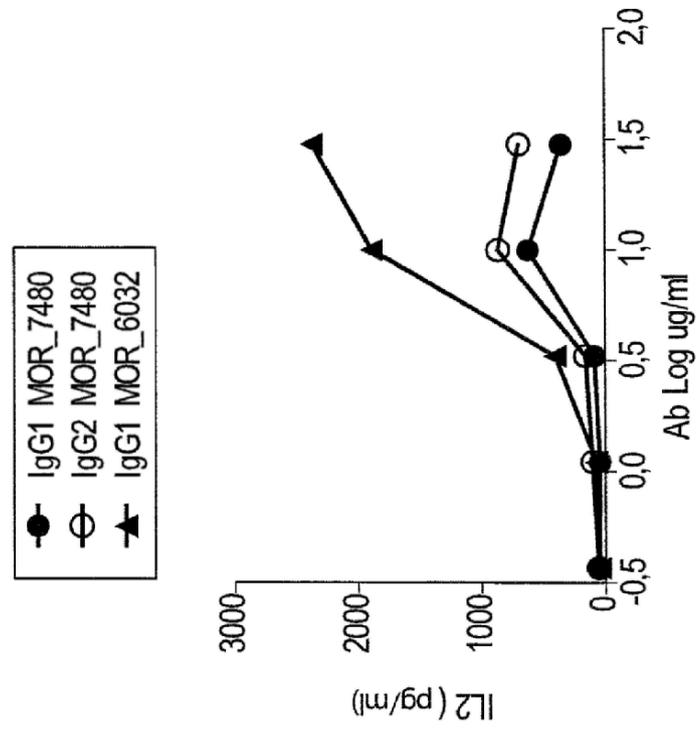


FIG. 4

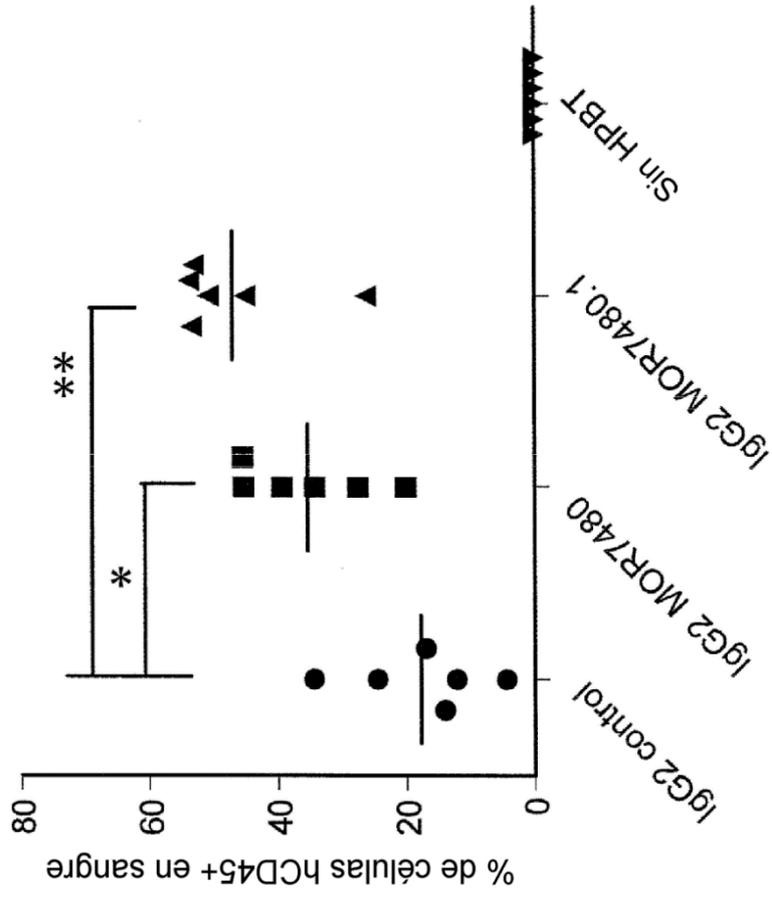


FIG. 5

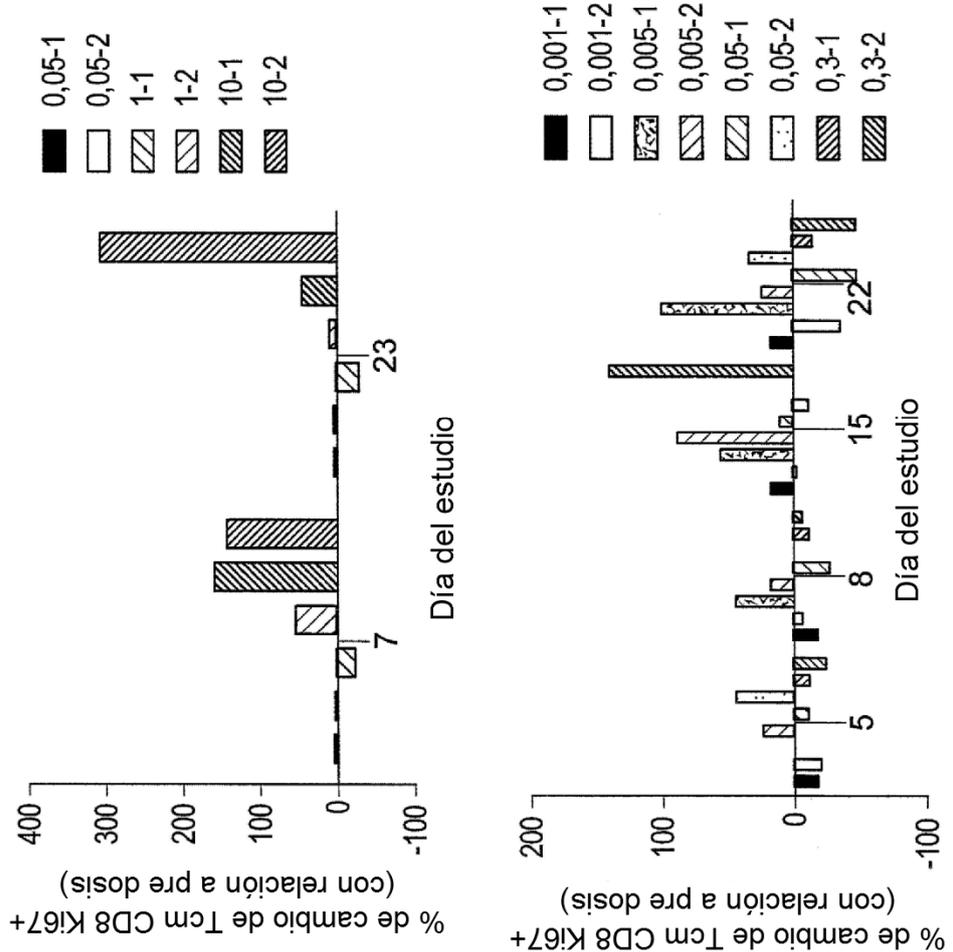


FIG. 6

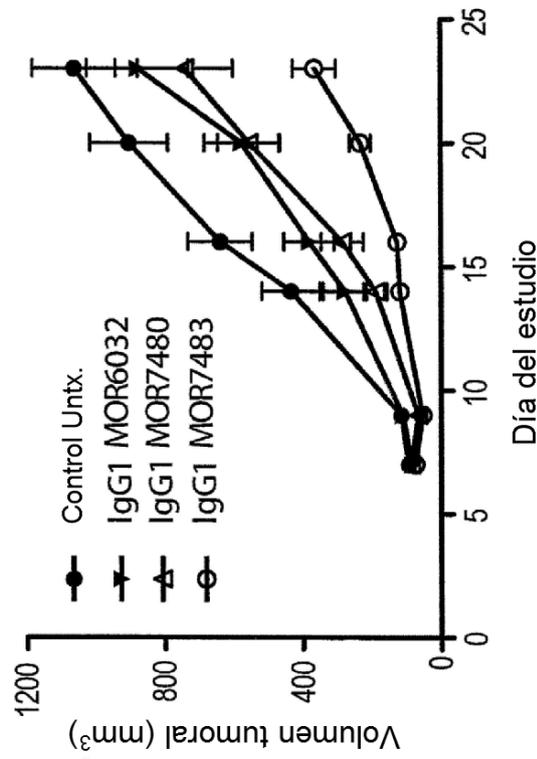
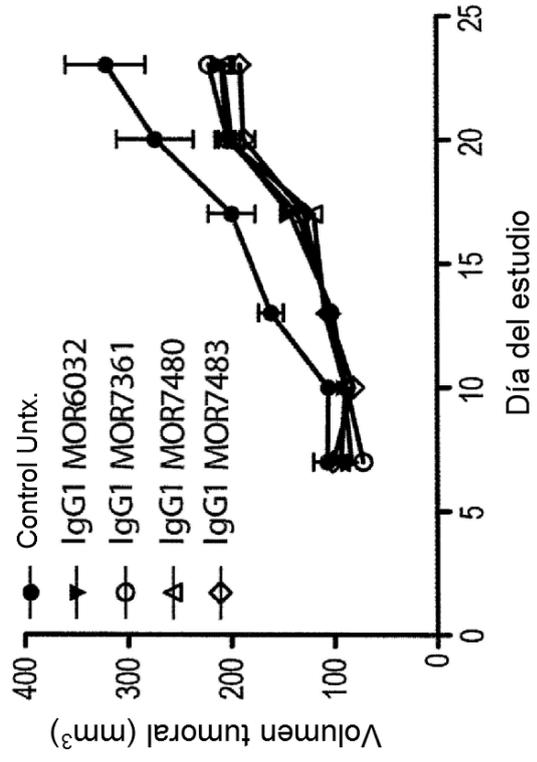


FIG. 7

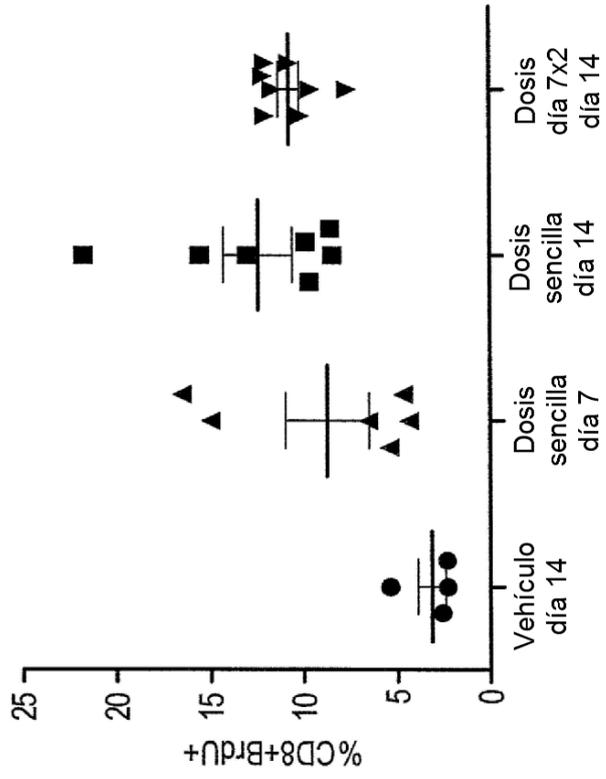
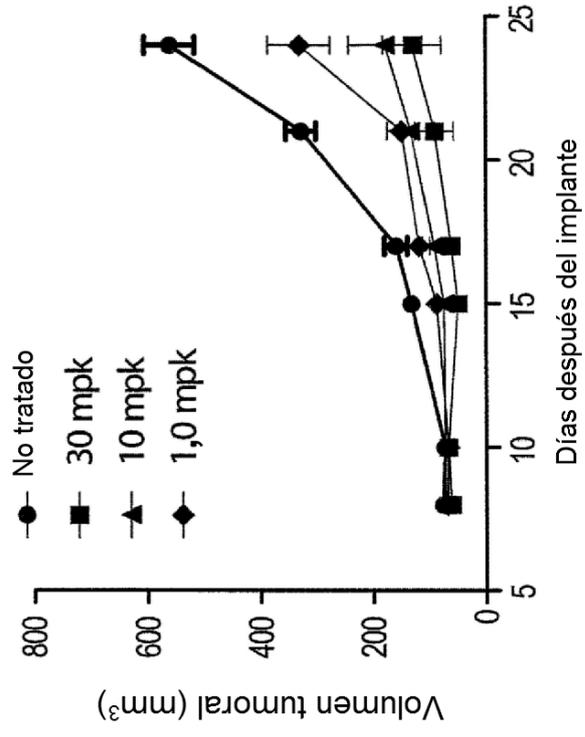


FIG. 8

Región variable de cadena pesada (las CDR están subrayadas)

GERMLINE VH1-69 QVQLVQSGAEVKKPQGSVKVSKASGGTFSVAISWVRQAPGQGLEWGGIIPFGTANVAQKQGRVTITADESTSTAYMELSSLSRSEDTAVYICARDYGGNSYFDYWGQGTLLVTVSS
 MOR 6032 VH QVQLVQSGAEVKKPQGSVKVSKASGGTFSVAISWVRQAPGQGLEWGGIIPFGTANVAQKQGRVTITADESTSTAYMELSSLSRSEDTAVYICARKNNEEDGGFDHWGQGTLLVTVSS

GERMLINE VH3-23 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYAMSWVRQAPCKGLEWVSAISGSGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLIYIQMNSLRAEDTAVYCAKRIILYNMCMLEYFDYWGQGTLLVTVSS
 MOR 7361 VH QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYMHVWRQAPCKGLEWVSAISGSGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLIYIQMNSLRAEDTAVYICAR---LY---AOFEGDFWGQGTLLVTVSS

GERMLINE VH5 EVQLVQSGAEVKKPQGSRLISCKGSGYSFTSYWIGWRQMPKGLEWNGLIYPGDSITRISPSFQGVVTSADKSISTAVLQWSSLKASDTAMYVCARGYSYGYFDYWGQGTLLVTVSS
 MOR 7480 VH QVQLVQSGAEVKKPQGSRLISCKGSGYSFTSYWISWRQMPCKGLEWNGKIYPGDSYTNVSPSFQGVVTSADKSISTAVLQWSSLKASDTAMYVCARG---YGIFFDYWGQGTLLVTVSS
 MOR7480.1 VH EVQLVQSGAEVKKPQGSRLISCKGSGYSFTSYWISWRQMPCKGLEWNGKIYPGDSYTNVSPSFQGVVTSADKSISTAVLQWSSLKASDTAMYVCARG---YGIFFDYWGQGTLLVTVSS
 MOR7480.2 VH EVQLVQSGAEVKKPQGSRLISCKGSGYSFTSYWISWRQMPCKGLEWNGKIYPGDSYTNVSPSFQGVVTSADKSISTAVLQWSSLKASDTAMYVCARG---YGIFFDYWGQGTLLVTVSS
 MOR 7483 VH QVQLVQSGAEVKKPQGSRLISCKGSGYSFTSYWISWRQMPCKGLEWNGKIYPGDSYTNVSPSFQGVVTSADKSISTAVLQWSSLKASDTAMYVCARG---YGIFFDYWGQGTLLVTVSS
 MOR7483.1 VH EVQLVQSGAEVKKPQGSRLISCKGSGYSFTSYWISWRQMPCKGLEWNGKIYPGDSYTNVSPSFQGVVTSADKSISTAVLQWSSLKASDTAMYVCARG---YGIFFDYWGQGTLLVTVSS
 MOR7483.2 VH EVQLVQSGAEVKKPQGSRLISCKGSGYSFTSYWISWRQMPCKGLEWNGKIYPGDSYTNVSPSFQGVVTSADKSISTAVLQWSSLKASDTAMYVCARG---YGIFFDYWGQGTLLVTVSS

Región variable de cadena ligera (las CDR están subrayadas)

GERMLINE VL3-1 SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDYACWYQKPKGQSPVLVIYQDSRPRSPGIPERFSGNSGNTATLTISGTAQMDADYYCOAWDSSIAV-VFGGGTKLTVL
 MOR 6032 VL DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGDNLGDYASWYQKPKGQAPVLVIYDSDNRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTAQMDADYYCQWDEGT-LHFVFGGTKLTVL
 MOR 7361 VL DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGDNIGSKYVSWYQKPKGQAPVLVIYDSESRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTAQMDADYYCQSWDGS--ISRVFGGTKLTVL
 MOR 7480 VL DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGDNIGDQYAHWYQKPKGQAPVVIYQDKNRPSPGIPERFSGNSGNTATLTISGTAQMDADYYCATYTFGSLAVFVGGGTKLTVL
 MOR7480.1 VL SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQKPKGQSPVLVIYQDKNRPSPGIPERFSGNSGNTATLTISGTAQMDADYYCATYTFGSLAVFVGGGTKLTVL
 MOR7480.2 VL SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQKPKGQSPVVIYQDKNRPSPGIPERFSGNSGNTATLTISGTAQMDADYYCATYTFGSLAVFVGGGTKLTVL
 MOR 7483 VL DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGDNIGDQYAHWYQKPKGQAPVVIYQDKNRPSPGIPERFSGNSGNTATLTISGTAQMDADYYCSTYTFVFGTTVFGGTKLTVL
 MOR7483.1 VL SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQKPKGQSPVLVIYQDKNRPSPGIPERFSGNSGNTATLTISGTAQMDADYYCSTYTFVFGTTVFGGTKLTVL
 MOR7483.2 VL SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQKPKGQSPVVIYQDKNRPSPGIPERFSGNSGNTATLTISGTAQMDADYYCSTYTFVFGTTVFGGTKLTVL