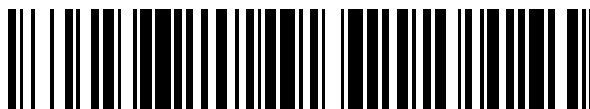


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 716**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/06** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2010** **PCT/US2010/024377**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.08.2010** **WO10096418**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2010** **E 10744211 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018** **EP 2398498**

54 Título: **Moléculas de anticuerpo que tienen especificidad por OX40 humano**

30 Prioridad:

**17.02.2009 US 153038 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.02.2019**

73 Titular/es:

**UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)**  
**Allée de la Recherche 60**  
**1070 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**LAWSON, ALASTAIR, DAVID, GRIFFITHS;**  
**NESBITT, ANDREW, MALCOLM;**  
**POPPLEWELL, ANDREW, GEORGE;**  
**SHAW, STEPHEN, GRAHAM;**  
**SHPEKTOR, DIANA y**  
**ZHANG, YI**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 699 716 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 anticuerpo que tienen especificidad por OX40 humano

- 5 La presente invención se refiere a moléculas de anticuerpo que tienen especificidad por determinantes antigénicos de OX40 y composiciones que comprenden las mismas. La presente invención también se refiere a los usos terapéuticos de las moléculas de anticuerpo, a composiciones y a procedimientos para producir dichas moléculas de anticuerpo.
- 10 El OX40 (también conocido como CD134, TNFRSF4, ACT35 o TXGP1L) es un miembro de la superfamilia de los receptores de TNF, que incluye 4-1BB, CD27, CD30 y CD40. El dominio de unión al ligando extracelular de OX40 está constituido por 3 dominios ricos en cisteína (CRD) completos y un cuarto CRD parcial C-terminal (Bodmer *et al.*, 2002, Trends Biochem Sci, 27, 19-26).
- 15 El ligando para OX40 es OX40L y 3 copias de OX40 se unen al ligando trimérico para formar el complejo OX40-OX40L (Compaan y Hymowitz, 2006, Structure, 14, 1321-1330). El OX40 es un receptor unido a la membrana; sin embargo, también se ha detectado una isoforma soluble (Taylor y Schwarz, 2001, J.Immunol. Methods, 255, 67-72). La importancia funcional de la forma soluble es actualmente desconocida. El OX40 no se expresa en células T en reposo, sino que se expresa de forma transitoria en células T activadas después de su unión al receptor de células T (TCR). El ligando para OX40, OX40L, es un miembro de la familia de TNF y se expresa en células presentadoras de antígeno activadas (APC), incluidas células B, macrófagos, células endoteliales y células dendríticas (DC).
- 20 El OX40 es un receptor coestimulador importante, requiriéndose una implicación secuencial de CD28 y OX40 para la proliferación y la supervivencia óptimas de células T. La unión de OX40 en células T activadas conduce a una mayor producción de citocinas y a la proliferación de células T, tanto CD4+ como CD8+ (Gramaglia *et al.*, 2000, J. Immunol, 165, 3043-3050, Bansal-Pakala *et al.*, 2004, J. Immunol, 172, 4821-425) y puede contribuir a las respuestas de Th1 y Th2 en curso (Gramaglia *et al.*, 1998, J. Immuno., 161, 6510-6517, Arestides *et al.*, 2002, Eur. J. Immunol. 32, 2874-2880). La coestimulación de OX40 prolonga la supervivencia de las células T más allá de la fase efectora inicial de la respuesta inmunitaria y aumenta el número de células T de memoria mediante la inhibición de la muerte de las células T efectoras.
- 25 Cuando la activación inmunitaria es excesiva o está incontrolada, pueden producirse alergia patológica, asma, inflamación, enfermedades autoinmunitarias y otras enfermedades relacionadas. Debido a que el OX40 funciona potenciando las respuestas inmunitarias, puede agravar enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias.
- 30 El papel de las interacciones OX40/OX40L en modelos de enfermedad se ha demostrado en ratones inactivados para OX40. En encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), se observó un modelo de esclerosis múltiple, signos clínicos menos graves de enfermedad e infiltrado inflamatorio reducido en el SNC de ratones inactivados para OX40 (Carboni *et al.*, 2003, J.Neuroimmunology, 145, 1-11). También los ratones inactivados para OX40 sensibilizados con, y expuestos a, ovoalbúmina muestran una inflamación pulmonar disminuida (80-90 % de reducción en eosinofilia), una producción de mucosidad reducida y una hiperreactividad de las vías respiratorias significativamente atenuada (Jember *et al.*, 2001, J. Exp. Med., 193, 387-392.). Los anticuerpos monoclonales para el ligando de OX40 murino han mostrado efectos beneficiosos en el modelo de artritis inducida por colágeno de artritis reumatoide (Yoshioka *et al.*, 2000, Eur. J. Immunol., 30, 2815-2823), EAE (Nohara *et al.*, 2001, J. Immunol., 166, 2108-2115), ratones diabéticos no obesos (NOD) (Pakala *et al.*, 2004, Eur. J. Immunol., 34, 3039-3046), colitis en ratones con células T restauradas (Malmstrom *et al.*, 2001, J. Immunol., 166, 6972-6981., Totsuka *et al.*, 2003, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 284, G595-G603) y modelos de inflamación pulmonar (Salek-Ardakani y otros, 2003, J. Exp. Med., 198, 315-324, Hoshino *et al.*, 2003, Eur.J. Immunol, 33, 861-869). Un anticuerpo para un OX40L humano se ha perfilado en un modelo de inflamación pulmonar en macacos Rhesus y dio como resultado niveles reducidos de IL-5, IL-13 y células T de memoria efectoras en líquido de lavado bronquiolar después de la exposición a alérgenos (Seshasayee *et al.*, 2007, J. Clin. Invest, 117, 3868-3878).
- 35 Se ha observado un aumento en la expresión de OX40 en diversas enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias. Esto incluye un aumento en la expresión de OX40 en células T aisladas del líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (Brugnoni D *et al.*, 1998, Br. J. Rheum., 37, 584-585; Yoshioka *et al.*, 2000, Eur. J. Immunol., 30, 2815-2823; Giacomelli R *et al.*, 2001, Clin. Exp. Rheumatol., 19, 317-320). De forma similar, se ha observado un aumento en la expresión de OX40 en el tejido gastrointestinal de pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn (Souza *et al.*, 1999, Gut, 45, 856-863; Stuber *et al.*, 2000, Eur.J.Clin.Invest., 30, 594-599) y en lesiones activas de pacientes con esclerosis múltiple (Carboni *et al.*, 2003, J.Neuroimmunology, 145, 1-11). El OX40L también se puede detectar en el músculo liso de las vías respiratorias (ASM) humanas y en pacientes con asma las células ASM muestran mayores respuestas inflamatorias a la unión de OX40L que los donantes sanos, lo que indica un papel para la vía OX40/OX40L en el asma (Burgess *et al.*, 2004, J. Allergy Clin Immunol., 113, 683-689; Burgess *et al.*, 2005, J. Allergy Clin Immunol., 115, 302-308). También se ha informado que las células T CD4+ aisladas de la sangre periférica de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) expresan niveles elevados de OX40, lo que se asocia con la actividad de la enfermedad (Patschan *et al.*, 2006, Clin. Exp. Immunol., 145, 235-242).
- 60
- 65

Dado el papel de OX40 en alergia, asma y enfermedades asociadas con autoinmunidad e inflamación, un enfoque de tratamiento en estas enfermedades consiste en bloquear la señalización de OX40-OX40L mediante el uso de anticuerpos anti-OX40L o anticuerpos antagonistas anti-OX40.

Se han descrito anticuerpos anti-OX40L; véase por ejemplo el documento WO2006/029879. Se han descrito numerosos anticuerpos agonistas anti-OX40, pero se conocen muy pocos anticuerpos antagonistas anti-OX40. Se ha producido un anticuerpo policlonal de conejo anti-OX40 de ratón por Stuber *et al.*, 1996, J.Exp.Med, 183, 979-989 que bloquea la interacción entre OX40 y OX40L. Se han generado anticuerpos monoclonales de ratón, 131 y 315, que se unen a OX40 humano, por Imura *et al.*, 1996, J.Exp.Med, 2185-2195.

Se han descrito anticuerpos antagonistas completamente humanos en el documento WO2007/062245; la afinidad más elevada de estos anticuerpos era una afinidad por OX40 expresado en la superficie celular (células T activadas) de 11 nM.

Se han descrito anticuerpos antagonistas humanizados en el documento WO2008/106116 y el anticuerpo con la mejor afinidad para OX40 tenía una afinidad de 0,94 nM.

Se han descrito otros anticuerpos anti-OX40, que incluyen L106 murino (patente de Estados Unidos N° 6.277.962) y ACT35 murino, disponible comercialmente en eBioscience.

En consecuencia, todavía existe la necesidad en la técnica de un anticuerpo anti-OX40 mejorado adecuado para tratar pacientes.

Ahora hemos identificado un anticuerpo anti-OX40 antagonista de alta afinidad adecuado para su uso en el tratamiento o la prevención de trastornos patológicos mediados por OX40 o asociados con un aumento del nivel de OX40.

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra determinadas secuencias de aminoácidos o ADN relacionadas con un anticuerpo según la divulgación.

La figura 2 muestra una representación en diagrama de un anticuerpo del formato A26 Fab'-PEG.

La figura 3 muestra la afinidad basada en células del anticuerpo A26 Fab'-PEG para OX40 de superficie celular.

La figura 4 muestra el porcentaje de inhibición de la unión de OX40L a células T activadas por el anticuerpo A26 Fab'-PEG.

La figura 5 muestra el porcentaje de inhibición de la proliferación de células T por el anticuerpo A26 Fab'-PEG en la MLR humana.

La figura 6 muestra la inhibición por A26 Fab'-PEG de la proliferación de PBMC expuestas a toxoide tetánico.

La figura 7 muestra el porcentaje de inhibición por A26 Fab'-PEG de la producción de IL-13 de PBMC expuestas a extracto alergénico de *Dermatophagoides pteronyssinus*.

La figura 8 muestra el porcentaje de inhibición por A26 Fab'-PEG de la producción de citocinas de PBMC expuestas a extracto alergénico de *Dermatophagoides pteronyssinus*.

La figura 9 muestra que el A26 Fab'-PEG inhibe la proliferación de células T CD4+ y CD8+ en un modelo de Hu-SCID.

La figura 10 muestra la inhibición de la puntuación de artritis (como área bajo la curva (AUC)) por A26 Fab'-PEG en un modelo *in vivo*.

La figura 11 muestra las puntuaciones histológicas totales en un modelo *in vivo* para artritis.

La presente invención se define por las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes definen otras formas de realización de la invención.

El anticuerpo de rata original del que se derivan los anticuerpos humanizados se denomina en el presente documento CA044\_00026.

El CA044\_00026 humanizado generalmente en forma de un fragmento Fab u otros fragmentos, se denomina A26.

El anticuerpo PEGilado "A26" en el formato que se muestra en la figura 2, se denomina en el presente documento A26 Fab'-PEG.

Los residuos de los dominios variables de anticuerpos se numeran convencionalmente según un sistema ideado por Kabat *et al.* Este sistema se establece por Kabat *et al.*, 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, Estados Unidos (en adelante "Kabat *et al.* (anteriormente)"). Este sistema de numeración se utiliza en la presente memoria descriptiva, salvo que se indique lo contrario.

Las designaciones de residuos de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos que en la numeración de Kabat estricta, o contener aminoácidos adicionales a la misma, correspondientes a un acortamiento de un componente estructural, o a una inserción en el mismo, ya sea un marco estructural o una región determinante de la complementariedad (CDR), de la estructura del dominio variable básico. La numeración correcta de Kabat de los residuos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineamiento de los residuos de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "patrón".

Las CDR del dominio variable de la cadena pesada están ubicadas en los residuos 31-35 (CDR-H1), los residuos 50-65 (CDR-H2) y los residuos 95-102 (CDR-H3) según el sistema de numeración Kabat. Sin embargo, según Chothia (Chothia, C. y Lesk, A.M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), el bucle equivalente a CDR-H1 se extiende desde el residuo 26 al residuo 32. Por lo tanto, a menos que se indique lo contrario, se pretende que "CDR-H1", tal como se emplea en el presente documento, se refiera a los residuos 26 a 35, tal como se describe mediante una combinación del sistema de numeración de Kabat y la definición de bucle topológico de Chothia.

Las CDR del dominio variable de la cadena ligera están ubicadas en los residuos 24-34 (CDR-L1), los residuos 50-56 (CDR-L2) y los residuos 89-97 (CDR-L3) según el sistema de numeración de Kabat.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpo antagonista" describe un anticuerpo que es capaz de inhibir y/o neutralizar la actividad de señalización biológica de OX40, por ejemplo, bloqueando la unión o reduciendo sustancialmente la unión de OX40 al ligando de OX40 e inhibiendo así la activación de OX40.

Los anticuerpos para su uso en la presente invención pueden obtenerse usando cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. El polipéptido/la proteína OX40, que incluye proteínas de fusión, por ejemplo se pueden utilizar proteínas de fusión OX40-Fc o células que expresan (de forma recombinante o natural) el polipéptido (tales como células T activadas) para producir anticuerpos que reconocen específicamente el OX40. El polipéptido OX40 puede ser el polipéptido "maduro" o un fragmento o un derivado biológicamente activo del mismo. De forma adecuada, el polipéptido OX40 es el polipéptido humano maduro o el dominio extracelular o un fragmento del mismo. El dominio extracelular comprende típicamente los aminoácidos 29-214 de la proteína OX40 (entrada P43489 de SWISS PROT). Los polipéptidos OX40 pueden prepararse mediante procesos bien conocidos en la técnica a partir de células huésped manipuladas genéticamente que comprenden sistemas de expresión o pueden recuperarse de fuentes biológicas naturales. En la presente solicitud, el término "polipéptidos" incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Estos se usan indistintamente a menos que se especifique lo contrario. El polipéptido OX40 puede ser parte, en algunos casos, de una proteína más grande, tal como una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada con una etiqueta de afinidad. Se pueden obtener anticuerpos generados frente al polipéptido OX40, cuando sea necesaria la inmunización de un animal, administrando los polipéptidos a un animal, preferentemente un animal no humano, utilizando protocolos bien conocidos y rutinarios; véase por ejemplo Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos o cerdos pueden inmunizarse. No obstante, los más adecuados, generalmente, son ratones, conejos, cerdos y ratas.

Los anticuerpos para su uso en la presente invención incluyen anticuerpos completos y fragmentos funcionalmente activos o derivados de los mismos y pueden ser, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, humanizados, completamente humanos o quiméricos.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein, 1975, Nature, 256: 495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.*, 1983, Immunology Today, 4:72) y la técnica de hibridoma de EBV (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, páginas 77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

También pueden generarse anticuerpos para su uso en la invención usando procedimientos de anticuerpos de linfocitos individuales mediante la clonación y la expresión de ADNc de la región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos mediante, por ejemplo, los procedimientos descritos por Babcook, J. *et al.*, 1996, Proc. Natl Acad Sci. USA 93 (15): 7843-78481; el documento WO92/02551; el documento WO2004/051268 y la solicitud de patente internacional número WO2004/106377.

El cribado de anticuerpos se puede realizar utilizando ensayos para medir la unión a OX40 humano y/o ensayos

para medir la capacidad para bloquear la unión de OX40 a su ligando, OX40L. Un ejemplo de un ensayo de unión es un ELISA, en particular utilizando una proteína de fusión de OX40 humano y Fc humano, que está inmovilizada en placas, y utilizando un anticuerpo secundario conjugado para detectar el anticuerpo anti-OX40 unido a la proteína de fusión. Un ejemplo de un ensayo de bloqueo es un ensayo basado en citometría de flujo que mide el bloqueo de la unión de la proteína de fusión de ligando de OX40 a OX40 en células CD4 humanas. Se utiliza un anticuerpo secundario marcado de forma fluorescente para detectar la cantidad de unión de la proteína de fusión del ligando de OX40 a la célula. Este ensayo busca una reducción en la señal, dado que el anticuerpo presente en el sobrenadante bloquea la unión de la proteína de fusión de ligando a OX40. Un ejemplo adicional de un ensayo de bloqueo es un ensayo en el que se mide el bloqueo de la coestimulación de células T humanas vírgenes mediada por la proteína de fusión de ligando de OX40 que recubre una placa midiendo la incorporación de timidina tritiada.

Los anticuerpos humanizados (que incluyen anticuerpos injertados con CDR) son moléculas de anticuerpos que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una especie no humana y una región estructural de una molécula de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.585.089; WO91/09967). Se apreciará que puede ser necesario transferir únicamente los residuos determinantes de la especificidad de las CDR en lugar de la CDR completa (véase, por ejemplo, Kashmiri *et al.*, 2005, Methods, 36, 25-34.). Los anticuerpos humanizados pueden comprender opcionalmente, además, uno o más residuos estructurales derivados de la especie no humana de la que se derivaron las CDR.

Los anticuerpos quiméricos están constituidos por elementos derivados de dos especies diferentes, de tal forma que los elementos conservan las características de las especies de las que se derivan. En general, un anticuerpo quimérico comprenderá una región variable de una especie, por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo o similar y una región constante de otra especie, tal como un ser humano.

Los anticuerpos para su uso en la presente invención también pueden generarse usando diversos procedimientos de presentación en fagos conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Brinkman *et al.* (J. Immunol. Methods, 1995, 182: 41-50), Ames *et al.* (J. Immunol. Methods, 1995, 184: 177-186), Kettleborough *et al.* (Eur. J. Immunol. 1994, 24: 952-958), Persic *et al.* (Gene, 1997 187 9-18), Burton *et al.* (Avances en inmunología, 1994, 57: 191-280) y los documentos WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 y US 5.698.426, 5.223.409, 5.403.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821.047, 5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727, 5.733.743 y 5.969.108.

Los anticuerpos completamente humanos son aquellos anticuerpos en los que las regiones variables y las regiones constantes (cuando están presentes) tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a las secuencias de origen humano, no necesariamente del mismo anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos completamente humanos pueden incluir anticuerpos producidos, por ejemplo, mediante los procedimientos de presentación en fagos descritos anteriormente y anticuerpos producidos por ratones en los que los genes de la región variable, y opcionalmente de la región constante, de inmunoglobulina murina se han reemplazado por sus homólogos humanos, por ejemplo tal como se describe en términos generales en los documentos EP0546073 B1, US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.661.016, US 5.770.429, EP 0438474 y EP0463151.

En un ejemplo, la presente divulgación proporciona un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, que comprende una cadena pesada, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende por lo menos una CDR que tiene la secuencia dada en la figura 1 (c) SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia dada en la figura 1 (c) SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 20 para CDR-H2 y una CDR que tiene la secuencia dada en la figura 1 (c) SEQ ID NO: 3 para CDR-H3.

En un ejemplo, la presente divulgación proporciona un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, que comprende una cadena pesada, en el que por lo menos dos de entre CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del dominio variable de la cadena pesada se seleccionan de las siguientes: la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 para CDR-H2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3 para CDR-H3. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en la que CDR-H1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 y CDR-H2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2. Como alternativa, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en la que CDR-H1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 y CDR-H3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3, o el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en la que CDR-H2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 y CDR-H3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3. Para evitar dudas, se entiende que todas las permutaciones están incluidas.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, que comprende una cadena pesada, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 para CDR-H2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3 para CDR-H3.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, que comprende una cadena pesada, en el que el dominio variable de la cadena pesada

comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 20 para CDR-H2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3 para CDR-H3.

En un ejemplo, la presente divulgación proporciona un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, que comprende una cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena ligera comprende por lo menos una CDR que tiene la secuencia dada en la figura 1 (c) SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 21 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia dada en la figura 1 (c) SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia dada en la figura 1 (c) SEQ ID NO: 6 para CDR-L3.

En otro ejemplo, la presente divulgación proporciona un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, que comprende una cadena ligera, en el que por lo menos dos de entre CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del dominio variable de la cadena ligera se seleccionan de las siguientes: la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-L3. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en la que CDR-L1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 y CDR-L2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5. Como alternativa, el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en la que CDR-L1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 y CDR-L3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6, o el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en la que CDR-L2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 y CDR-L3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6. Para evitar dudas, se entiende que todas las permutaciones están incluidas.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, que comprende una cadena ligera, en el que el dominio variable comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-L3.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, que comprende una cadena ligera, en el que el dominio variable comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 21 para CDR-L1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-L3.

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención comprenden de forma adecuada una cadena ligera complementaria y una cadena pesada complementaria.

Por lo tanto, en una forma de realización, un anticuerpo según la presente invención comprende una cadena pesada, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 20 para CDR-H2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3 para CDR-H3 y una cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 21 para CDR-L1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-L3.

Se apreciará que se pueden realizar una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos en las CDR proporcionadas por la presente invención sin alterar significativamente la capacidad del anticuerpo para unirse a OX40 y neutralizar la actividad de OX40. Un experto en la técnica puede evaluar fácilmente el efecto de cualquier sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos, por ejemplo utilizando los procedimientos descritos en el presente documento, en particular en los ejemplos, para determinar la unión de OX40 y la inhibición de la interacción OX40/OX40L. En consecuencia, la presente divulgación proporciona un anticuerpo que tiene especificidad por OX40 humano que comprende una o más CDR seleccionadas de entre CDRH-1 (SEQ ID NO: 1), CDRH-2 (SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 20), CDRH-3 (SEQ ID NO: 3), CDRL-1 (SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 21), CDRL-2 (SEQ ID NO: 5) y CDRL-3 (SEQ ID NO: 6) en el que uno o más aminoácidos de una o más de las CDR se han sustituido por otro aminoácido, de forma adecuada un aminoácido similar tal como se define a continuación en el presente documento. En un ejemplo, la presente invención proporciona un anticuerpo que tiene especificidad para OX40 humano que comprende CDRH-1 (SEQ ID NO: 1), CDRH-2 (SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 20), CDRH-3 (SEQ ID NO: 3), CDRL-1 (SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 21), CDRL-2 (SEQ ID NO: 5) y CDRL-3 (SEQ ID NO: 6) tal como se muestra en la figura 1 (c), por ejemplo, en el que uno o más aminoácidos de una o más de las CDR se han sustituido por otro aminoácido, tal como un aminoácido similar tal como se define a continuación en el presente documento.

En un ejemplo, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende tres CDR en las que la secuencia de CDRH-1 tiene por lo menos el 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1, CDRH-2 tiene por lo menos el 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 y/o CDRH-3 tiene por lo menos el 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3. En otro ejemplo, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende tres CDR en las que la secuencia de CDRH-1 tiene por lo menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1, CDRH-2 tiene por lo menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 y/o CDRH-3 tiene por lo menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3.

"Identidad", como se usa en este documento, indica que en cualquier posición particular en las secuencias alineadas el residuo de aminoácido es idéntico entre las secuencias. "Similitud", tal como se utiliza en el presente documento, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina puede sustituirse por isoleucina o valina. Otros aminoácidos que a menudo se pueden sustituir entre sí incluyen, pero sin limitación:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);

- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);

- aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);

- asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales de amida); y

- cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre). Los grados de identidad y similitud se pueden calcular fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M. y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991, el programa informático BLAST™ disponible de NCBI (Altschul, S.F. *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3: 266-272. Madden, T.L. *et al.*, 1996, Meth. Enzymol. 266: 131-141; Altschul, S.F. *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402; Zhang, J. y Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7: 649-656).

En otro ejemplo, un anticuerpo de la presente divulgación comprende una cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena ligera comprende tres CDR en las que la secuencia de CDRL-1 tiene por lo menos el 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4, CDRL-2 tiene por lo menos el 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 y/o CDRL-3 tiene por lo menos el 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6. En otro ejemplo, un anticuerpo de la presente divulgación comprende una cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena ligera comprende tres CDR en las que la secuencia de CDRL-1 tiene por lo menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4, CDRL-2 tiene por lo menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 y/o CDRL-3 tiene por lo menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6.

En una forma de realización, el anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo monoclonal.

En una forma de realización, el anticuerpo proporcionado por el presente documento es un anticuerpo quimérico.

En una forma de realización, el anticuerpo proporcionado por la presente invención es una molécula de anticuerpo injertada con CDR que comprende una o más de las CDR proporcionadas en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 20 y 21 (figura 1 (c)). Tal como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de anticuerpo injertada con CDR" se refiere a una molécula de anticuerpo en la que la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDR (incluidas, si se desea, una o más CDR modificadas) de un anticuerpo donante (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino) injertadas en un marco estructural de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano). Para una revisión, véase Vaughan *et al.*, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. En una forma de realización, en lugar de que se transfiera la CDR completa, solo se transfieren uno o más de los residuos determinantes de la especificidad de una cualquiera de las CDR descritas anteriormente en el presente documento al marco estructural del anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Kashmiri *et al.*, 2005, Methods, 36, 25-34). En una forma de realización, solo los residuos determinantes de la especificidad de una o más de las CDR descritas en el presente documento anteriormente se transfieren al marco estructural del anticuerpo humano. En otra forma de realización, solo los residuos determinantes de la especificidad de cada una de las CDR descritas en el presente documento anteriormente se transfieren al marco estructural del anticuerpo humano.

Cuando se injertan las CDR o los residuos determinantes de la especificidad, se puede utilizar cualquier secuencia de marco estructural de la región variable del aceptor apropiada en función de la clase/el tipo del anticuerpo donante del que se derivan las CDR, incluidas regiones estructurales de ratón, primate y humano. De forma adecuada, el anticuerpo injertado con CDR según la presente invención tiene un dominio variable que comprende regiones estructurales aceptoras humanas así como uno o más de las CDR o residuos determinantes de la especificidad descritos anteriormente. Por lo tanto, en una forma de realización se proporciona un anticuerpo injertado con CDR neutralizante en el que el dominio variable comprende regiones estructurales aceptoras humanas y CDR donantes no humanas.

Algunos ejemplos de marcos estructurales humanos que se pueden usar en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat *et al.*, anteriormente). Por ejemplo, KOL y NEWM se pueden utilizar para la

cadena pesada, REI se puede utilizar para la cadena ligera y EU, LAY y POM se pueden utilizar tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. Como alternativa, pueden utilizarse secuencias de línea germinal humana; estas están disponibles en: <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>

- 5 En un anticuerpo injertado con CDR de la presente invención, no es necesario que las cadenas pesadas y ligeras aceptoras deban derivarse del mismo anticuerpo y, si se desea, pueden comprender cadenas compuestas que tienen regiones estructurales derivadas de diferentes cadenas.

10 La región estructural adecuada para la cadena pesada del anticuerpo injertado con CDR de la presente invención se deriva de la secuencia de VH3 del subgrupo humano 1-3 3-07 junto con JH4. En consecuencia, se proporciona un anticuerpo injertado con CDR neutralizante que comprende por lo menos una CDR donante no humana en el que la región estructural de la cadena pesada se deriva de la secuencia VH3 del subgrupo humano 1-3 3-07 junto con JH4. La secuencia de JH4 humano es la siguiente: (YFDY) WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 22). El motivo YFDY es parte de CDR-H3 y no es parte del marco estructural 4 (Ravetch, JV. *et al.*, 1981, Cell, 27, 583-591).

15 La región estructural adecuada para la cadena ligera del anticuerpo injertado con CDR de la presente invención se deriva de la secuencia VK1 del subgrupo de línea germinal humana 2-1 1-02 junto con JK4. Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo injertado con CDR neutralizante que comprende por lo menos una CDR donante no humana en la que la región estructural de la cadena ligera se deriva de la secuencia del subgrupo humano 2-1 1-02 junto con JK4. La secuencia JK1 es la siguiente: (WT) FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 23). El motivo WT es parte de CDR-L3 y no es parte del marco estructural 4 (Hieter, PA., *Et al.*, 1982, J. Biol. Chem., 257, 1516-1522).

20 Además, en un anticuerpo injertado con CDR de la presente invención, no es necesario que las regiones estructurales tengan exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, los residuos no habituales pueden cambiarse por residuos más frecuentes para esa clase o tipo de cadena aceptora. Como alternativa, los residuos seleccionados en las regiones estructurales aceptoras pueden cambiarse de forma que correspondan al residuo que se encuentra en la misma posición en el anticuerpo donante (véase Reichmann *et al.*, 1998, Nature, 332, 323-324.). Dichos cambios deben mantenerse en el mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donante. Un protocolo para seleccionar residuos de las regiones estructurales aceptoras que pueden necesitar modificarse se indica en el documento WO 91/09967.

De forma adecuada, en una molécula de anticuerpo injertada con CDR de la presente invención, si la cadena pesada aceptora tiene la secuencia VH3 humana 1-3 3-07 junto con JH4, entonces las regiones estructurales aceptoras de la cadena pesada comprenden, además de una o más CDR donantes, un residuo donante en por lo menos una de las posiciones 37, 73, 78 o 94 (según Kabat *et al.*, (anteriormente)). En consecuencia, se proporciona un anticuerpo injertado con CDR, en el que por lo menos los residuos de las posiciones 37, 73, 78 y 94 del dominio variable de la cadena pesada son residuos donantes.

40 De forma adecuada, en una molécula de anticuerpo injertada con CDR según la presente invención, si la cadena ligera aceptora tiene la secuencia 2-1 1-02 de VK1 del subgrupo humano junto con JK4, entonces las regiones estructurales aceptoras de la cadena ligera comprenden, además de una o más CDR donantes, un residuo donante en por lo menos una de las posiciones 64 o 71. En consecuencia, se proporciona un anticuerpo injertado con CDR, en el que por lo menos los residuos de las posiciones 64 y 71 del dominio variable de la cadena ligera son residuos donantes.

45 Los residuos donantes son residuos del anticuerpo donante, es decir, el anticuerpo del cual se derivaron originariamente las CDR.

50 En una forma de realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, comprendiendo el dominio variable de la cadena pesada la secuencia dada en la figura 1 (b) SEQ ID NO: 9.

Se apreciará que se pueden realizar una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos en los dominios variables del anticuerpo, proporcionados por la presente invención, sin alterar significativamente la capacidad del anticuerpo para unirse a OX40 y para neutralizar la actividad de OX40. Un experto en la técnica puede analizar fácilmente el efecto de cualesquiera sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos, por ejemplo utilizando los procedimientos descritos en el presente documento, en particular los ejemplos, para determinar la unión de OX40 y el bloqueo de ligandos.

60 En un ejemplo, un anticuerpo de la presente divulgación comprende una cadena pesada, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene por lo menos el 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9. En una forma de realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene por lo menos el 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9.

65 En una forma de realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en la figura 1 (a) SEQ ID NO: 7.

En otro ejemplo, un anticuerpo de la presente divulgación comprende una cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene por lo menos el 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7. En una forma de realización, el anticuerpo de la presente invención comprende una cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene por lo menos un 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7.

En una forma de realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9, y una cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 7.

En otro ejemplo de la divulgación, el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene por lo menos el 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9, y en el que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene por lo menos el 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7. De forma adecuada, el anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene por lo menos el 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9, y una cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene por lo menos un 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7.

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención pueden comprender una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesadas y ligeras de longitud completa o un fragmento de las mismas y pueden ser, pero sin limitación, Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, VH o VL o VHH), scFv, anticuerpos bivalentes, trivalentes o tetravalentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a epítopo de cualquiera de los anteriores (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech. 23 (9): 1126-1136; Adair y Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2 (3), 209-217). Los procedimientos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Verma *et al.*, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Otros fragmentos de anticuerpos para su uso en la presente invención incluyen los fragmentos Fab y Fab' descritos en las solicitudes de patente internacional WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades o pueden ser monoespecíficos (véanse, por ejemplo, los documentos WO 92/22853 y WO05/113605).

En una forma de realización, el anticuerpo según la presente divulgación se proporciona como una proteína de fusión de anticuerpo de unión a OX40 que comprende un resto de inmunoglobulina, por ejemplo un fragmento Fab o Fab', y uno o dos anticuerpos de dominio único (dAb) unidos directamente o indirectamente al mismo, por ejemplo, tal como se describe en el documento WO2009/040562.

En una forma de realización, la proteína de fusión comprende dos anticuerpos de dominio, por ejemplo, como un emparejamiento de variable pesada (VH) y variable ligera (VL), opcionalmente unidos por un enlace disulfuro.

En una forma de realización, el elemento Fab o Fab' de la proteína de fusión tiene la misma o similar especificidad que el anticuerpo o anticuerpos de dominio único. En una forma de realización, el Fab o Fab' tiene una especificidad diferente al anticuerpo o anticuerpos de dominio único, es decir, la proteína de fusión es multivalente. En una forma de realización, una proteína de fusión multivalente según la presente invención presenta un sitio de unión a albúmina, por ejemplo, un par VH/VL, que proporciona un sitio de unión a albúmina en el mismo.

Los dominios de región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si están presentes, pueden seleccionarse teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula de anticuerpo, y en particular las funciones efectoras que pueden requerirse. Por ejemplo, los dominios de región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanas. En particular, se pueden usar dominios de región constante de IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3, cuando la molécula de anticuerpo está destinada a usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras de anticuerpos. Como alternativa, los isotipos IgG2 e IgG4 pueden usarse cuando la molécula de anticuerpo está destinada a fines terapéuticos y no se requieren funciones efectoras de anticuerpos, por ejemplo, para bloquear simplemente la actividad de OX40. Se apreciará que también se pueden utilizar variantes de secuencia de estos dominios de región constante. Por ejemplo, pueden utilizarse moléculas de IgG4 en las que la serina de la posición 241 se ha cambiado a prolina tal como se describe por Angal *et al.*, Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108. Un experto en la técnica también entenderá que los anticuerpos pueden experimentar una diversidad de modificaciones postraduccionales. El tipo y la medida de estas modificaciones dependen a menudo de la línea de célula huésped utilizada para expresar el anticuerpo, así como de las condiciones de cultivo. Dichas modificaciones pueden incluir variaciones en la glicosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperazina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un residuo básico carboxi-terminal (tal como lisina o arginina) debido a la acción de las carboxipeptidasas (tal como se describe por Harris, R.J. Journal of Chromatography 705: 129-134, 1995). En consecuencia, la lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo dada en la figura 1 (f), SEQ ID NO: 15 puede estar ausente.

En una forma de realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende un dominio CH1 y la cadena ligera del anticuerpo comprende un dominio CL, o bien kappa o bien lambda.

5 En una forma de realización, el anticuerpo proporcionado por la presente invención es un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano en el que la región constante de la cadena pesada comprende una región bisagra modificada. En consecuencia, la presente invención proporciona un anticuerpo en el que la cadena pesada comprende o consiste en la secuencia dada en la figura 1 (f), SEQ ID NO: 15.

10 Se apreciará que se pueden realizar una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos en los dominios variables y/o constantes del anticuerpo proporcionado por la presente invención sin alterar significativamente la capacidad del anticuerpo para unirse a OX40 y para neutralizar la actividad de OX40. Un experto en la técnica puede evaluar fácilmente el efecto de cualesquiera sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos, por ejemplo, utilizando los procedimientos descritos en el presente documento, en particular en los  
15 ejemplos, para determinar la unión de OX40 y el bloqueo de la interacción OX40/OX40L.

En una forma de realización de la invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en el que la cadena pesada comprende una secuencia que tiene por lo menos el 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15. De forma adecuada, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en el que la cadena pesada  
20 comprende una secuencia que tiene por lo menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15.

En una forma de realización, una molécula de anticuerpo según la presente invención comprende una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la figura 1 (d), SEQ ID NO: 11.

25 En una forma de realización de la invención, el anticuerpo comprende una cadena ligera, en el que la cadena ligera comprende una secuencia que tiene por lo menos el 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 11. Por ejemplo, el anticuerpo comprende una cadena ligera, en el que la cadena ligera comprende una secuencia que tiene por lo menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada  
30 en la SEQ ID NO: 11.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo en el que la cadena pesada comprende, o consiste en, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15 y la cadena ligera comprende, o consiste en, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 11.

35 En una forma de realización de la invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende una secuencia que tiene por lo menos el 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15, y en el que la cadena ligera comprende una secuencia que tiene por lo menos el 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 11. En general, el anticuerpo comprende  
40 una cadena pesada, en el que la cadena pesada comprende una secuencia que tiene por lo menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15, y una cadena ligera, en el que la cadena ligera comprende una secuencia que tiene por lo menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 11.

45 Las moléculas biológicas, tales como anticuerpos o fragmentos, contienen grupos funcionales ácidos y/o básicos, que proporcionan a la molécula una carga neta positiva o negativa. La cantidad de carga general "observada" dependerá de la secuencia de aminoácidos absoluta de la entidad, el entorno local de los grupos cargados en la estructura 3D y las condiciones ambientales de la molécula. El punto isoeléctrico (pI) es el pH en el que una molécula particular o una superficie de la misma accesible al disolvente no tiene carga eléctrica neta. En una forma  
50 de realización, el anticuerpo o fragmento según la presente divulgación tiene un punto isoeléctrico (pI) de por lo menos 7. En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento tiene un punto isoeléctrico de por lo menos 8, tal como 8,5, 8,6, 8,7, 8,8 o 9.

55 El anticuerpo OX40 y los fragmentos de la invención se han manipulado para que tengan un punto isoeléctrico apropiado. Esto puede dar lugar a anticuerpos y/o fragmentos con propiedades más robustas, en particular perfiles de solubilidad y/o estabilidad adecuados y/o características de purificación mejoradas.

Así, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo OX40 humanizado manipulado para que tenga un punto isoeléctrico diferente al del anticuerpo identificado originariamente CA044\_00026. El anticuerpo puede manipularse,  
60 por ejemplo, reemplazando un residuo de aminoácido, por ejemplo reemplazando un residuo de aminoácido ácido por uno o más residuos de aminoácidos básicos. Como alternativa, pueden introducirse residuos de aminoácidos básicos o pueden eliminarse residuos de aminoácidos ácidos. Como alternativa, si la molécula tiene un valor de pI inaceptablemente alto, pueden introducirse residuos ácidos para disminuir el pI, según se requiera. El pI diana del anticuerpo o fragmento manipulado puede ser, de forma deseable, por ejemplo, 8 o superior, tal como 8,5 o 9. Es importante que al manipular el pI se tenga cuidado en retener la actividad deseable del anticuerpo o fragmento. Así,  
65 en una forma de realización, el anticuerpo o fragmento manipulado tiene la misma o sustancialmente la misma

actividad que el anticuerpo o fragmento "sin modificar".

Programas tales como \*\*EXPASY [http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html), y [http://www.iut-arles.univ-mrs.fr/w3bb/d\\_abim/compo-p.html](http://www.iut-arles.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html), se puede utilizar para predecir el punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento.

La presente divulgación también proporciona una región específica, o epítipo específico, de OX40 humano que está unida por medio de un anticuerpo proporcionado por la presente invención, en particular un anticuerpo que comprende la secuencia de la cadena pesada gH2 (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de la cadena ligera gL8 (SEQ ID NO: 7).

Esta región específica o el epítipo específico del polipéptido OX40 humano puede identificarse mediante cualquier procedimiento de mapeo de epítopes adecuado conocido en la técnica en combinación con cualquiera de los anticuerpos proporcionados por la presente invención. Los ejemplos de dichos procedimientos incluyen el cribado de péptidos de longitudes variables derivados de OX40 para su unión al anticuerpo de la presente invención con el fragmento más pequeño que puede unirse específicamente al anticuerpo que contenga la secuencia del epítipo reconocido por el anticuerpo. Los péptidos OX40 pueden producirse sintéticamente o por digestión proteolítica del polipéptido OX40. Los péptidos que se unen al anticuerpo pueden identificarse, por ejemplo, mediante análisis espectrométrico de masas. En otro ejemplo, se puede utilizar la espectroscopía de RMN o la cristalografía de rayos X para identificar el epítipo unido con un anticuerpo de la presente invención. Una vez identificado, el fragmento epitópico que se une a un anticuerpo de la presente invención se puede utilizar, si se requiere, como un inmunógeno para obtener anticuerpos antagonistas adicionales que se unen al mismo epítipo.

Los anticuerpos que bloquean de forma cruzada la unión de un anticuerpo según la presente invención, en particular un anticuerpo que comprende la secuencia de la cadena pesada gH2 (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de la cadena ligera gL8 (SEQ ID NO: 7), pueden ser igualmente útiles para antagonizar la actividad de OX40. En consecuencia, la presente descripción también proporciona un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, que bloquea de forma cruzada la unión de uno cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente a OX40 humano y/o su unión a OX40 está bloqueada de forma cruzada por uno cualquiera de esos anticuerpos. En un ejemplo, un anticuerpo de este tipo se une al mismo epítipo que un anticuerpo descrito anteriormente en el presente documento. En otro ejemplo, el anticuerpo neutralizante de bloqueo cruzado se une a un epítipo que limita y/o se superpone con el epítipo unido con un anticuerpo descrito anteriormente en el presente documento. En otro ejemplo, el anticuerpo neutralizante de bloqueo cruzado de este aspecto de la invención no se une al mismo epítipo que un anticuerpo de la presente invención ni a un epítipo que limita y/o se solapa con dicho epítipo.

Los anticuerpos de bloqueo cruzado pueden identificarse utilizando cualquier procedimiento adecuado de la técnica, por ejemplo, utilizando ensayos ELISA de competencia o BIAcore, en los que la unión del anticuerpo de bloqueo cruzado al OX40 humano evita la unión de un anticuerpo de la presente invención o viceversa.

En un ejemplo, se proporciona un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, que bloquea de forma cruzada la unión de un anticuerpo cuya cadena pesada comprende la secuencia gH2 (SEQ ID NO: 9) y cuya cadena ligera comprende la secuencia gL8 (SEQ ID NO: 7) a OX40 humano. En un ejemplo, los anticuerpos de bloqueo cruzado proporcionados por la presente invención inhiben la unión de un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada gH2 (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de cadena ligera gL8 (SEQ ID NO: 7) en más del 80 %, por ejemplo, en más del 85 %, tal como en más del 90 %, en particular en más del 95 %.

Como alternativa o adicionalmente, los anticuerpos antagonistas según este aspecto de la divulgación pueden bloquearse de forma cruzada para que no se unan a OX40 humano por medio de un anticuerpo que comprende la secuencia de la cadena pesada gH2 (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de la cadena ligera gL8 (SEQ ID NO: 7). Por lo tanto, también se proporciona una molécula de anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano cuya unión a OX40 humano está bloqueada de forma cruzada por un anticuerpo que comprende la secuencia de la cadena pesada gH2 (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de la cadena ligera gL8 (SEQ ID NO: 7). En un ejemplo, la unión de los anticuerpos antagonistas proporcionados por este aspecto de la divulgación a OX40 humano está inhibida por un anticuerpo que comprende la secuencia de la cadena pesada gH2 (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de la cadena ligera gL8 (SEQ ID NO: 7) en más del 80 %, por ejemplo, en más del 85 %, por ejemplo, en más del 90 %, en particular en más del 95 %.

En un ejemplo, los anticuerpos de bloqueo cruzado proporcionados por la presente invención son completamente humanos. En un ejemplo, los anticuerpos de bloqueo cruzado proporcionados por la presente invención están humanizados. En un ejemplo, los anticuerpos de bloqueo cruzado proporcionados por la presente invención tienen una afinidad por OX40 humano de 100 pM o mejor. En un ejemplo, los anticuerpos de bloqueo cruzado proporcionados por la presente invención tienen una afinidad por OX40 humano de 50 pM o mejor.

En un ejemplo, el anticuerpo de bloqueo cruzado tiene un punto isoeléctrico de por lo menos 7, por ejemplo por lo menos 8, tal como 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 o 9,0.

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen de forma adecuada una alta afinidad de unión, en

particular en el intervalo picomolar. La afinidad se puede medir utilizando cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, incluido BIAcore, tal como se describe en los ejemplos en el presente documento, utilizando OX40 natural o recombinante aislado o una proteína/polipéptido de fusión adecuado. En un ejemplo, la afinidad se mide utilizando el dominio extracelular de OX40 humano recombinante tal como se describe en los ejemplos en el presente documento. En un ejemplo, el dominio extracelular de OX40 humano recombinante utilizado es un dímero, por ejemplo un dímero de fusión Fc. De forma adecuada, las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen una afinidad de unión por OX40 humano aislado de aproximadamente 200 pM o mejor. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o mejor. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 50 pM o mejor. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 40 pM o mejor. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 30 pM o mejor. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención es completamente humana o humanizada y tiene una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o mejor.

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen, de forma adecuada, una alta afinidad de unión por OX40 humano expresado en la superficie de células T activadas, por ejemplo una afinidad en el intervalo nanomolar o picomolar. La afinidad se puede medir utilizando cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, incluido el procedimiento descrito en los ejemplos del presente documento que utiliza células T humanas CD4<sup>+</sup> OX40<sup>+</sup> activadas. En particular, las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen una afinidad de unión por OX40 humano expresado en la superficie celular de aproximadamente 2 nM o mejor. En un ejemplo, las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen una afinidad de unión por OX40 humano expresado en la superficie celular de aproximadamente 1,5 nM o mejor. En otro ejemplo, las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen una afinidad de unión por OX40 humano expresado en la superficie celular de aproximadamente 1,2 nM o mejor. En una forma de realización, se proporciona una molécula de anticuerpo completamente humana o humanizada que tiene una afinidad de unión de aproximadamente 2 nM o mejor por OX40 humano expresado en la superficie celular.

Se apreciará que la afinidad de los anticuerpos proporcionada por la presente invención puede alterarse utilizando cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a variantes de las moléculas de anticuerpos de la presente invención que tienen una afinidad mejorada por OX40. Dichas variantes se pueden obtener mediante una serie de protocolos de maduración de afinidad, incluida la mutación de las CDR (Yang *et al.*, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), la variación del orden de las cadenas (Marks *et al.*, Bio / Technology, 10, 779-783, 1992), el uso de cepas mutantes de *E. coli* (Low *et al.*, J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), la variación del orden del ADN (Patten *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), presentación en fagos (Thompson *et al.*, J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Cramer *et al.*, Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan *et al.* (anteriormente) debaten sobre estos procedimientos de maduración de afinidad.

En una forma de realización, las moléculas de anticuerpo de la presente invención bloquean la interacción entre OX40 y OX40L. Numerosos ensayos adecuados para determinar la capacidad de un anticuerpo para bloquear esta interacción se describen en los ejemplos en el presente documento. En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene una especificidad por OX40 humano que es capaz de inhibir la unión de OX40L humano (analizado a una concentración final de 2 µg/ml) a células T CD4<sup>+</sup> OX40<sup>+</sup> humanas activadas en un 50 % a una concentración inferior a 5 nM. En una forma de realización, el OX40L humano usado en el ensayo es OX40 humano natural. En una forma de realización, el OX40 humano usado en el ensayo es OX40 humano recombinante. En una forma de realización, el anticuerpo neutralizante es un anticuerpo humanizado o completamente humano.

Si se desea, un anticuerpo para su uso en la presente invención puede conjugarse con una o más moléculas efectoras. Se apreciará que la molécula efectora puede comprender una única molécula efectora o dos o más de dichas moléculas unidas de forma que formen un único resto que puede unirse a los anticuerpos de la presente invención. Cuando se desee obtener un fragmento de anticuerpo unido a una molécula efectora, este puede prepararse mediante procedimientos químicos estándar o de ADN recombinante en los que el fragmento de anticuerpo se une directamente o por medio de un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar tales moléculas efectoras con anticuerpos son bien conocidas en la técnica (véase Hellstrom *et al.*, Controlled Drug Delivery, 2<sup>a</sup> ed., Robinson *et al.*, Eds., 1987, páginas 623-53; Thorpe *et al.*, 1982, Immunol. Rev., 62: 119-58 y Dubowchik *et al.*, 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123.). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO03031581. Como alternativa, cuando la molécula efectora es una proteína o un polipéptido, el enlace se puede lograr utilizando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo tal como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP0392745.

La expresión molécula efectora, tal como se usa en el presente documento, incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros de origen sintético o natural, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, por ejemplo ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos,

metales quelados, nanopartículas y grupos informadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse mediante espectroscopia de RMN o ESR.

Los ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos que incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo que las destruya). Los ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporinas, maitansinoides, espongistatinas, rizoxinas, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

Las moléculas efectoras también incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil-decarbazona), agentes alquilantes (por ejemplo mecloretamina, tioepa-clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomantol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), calicheamicinas o duocarmicinas) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados, tales como  $^{111}\text{In}$  e  $^{90}\text{Y}$ ,  $\text{Lu}^{177}$ , bismuto $^{213}$ , californio $^{252}$ , iridio $^{192}$  y tungsteno $^{188}$ /renio $^{188}$ ; o fármacos tales como, pero sin limitación, alquilfosfolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina. Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero sin limitación, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero sin limitación, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, pseudomonas exotoxina o toxina de la difteria, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, interferón  $\alpha$ , interferón  $\beta$ , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador del plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente antiangiogénico, por ejemplo angiostatina o endostatina, o un modificador de respuesta biológica tal como una linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles, por ejemplo, en diagnóstico. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radiactivos, metales emisores de positrones (para su uso en tomografía por emisión de positrones) y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase, en general, la patente de Estados Unidos N° 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como materiales para diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los núclidos radiactivos adecuados incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  y  $^{99}\text{Tc}$ .

En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la semivida del anticuerpo *in vivo*, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o mejorar la administración de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunológico. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a albúmina, tales como los descritos en el documento WO05/117984.

Cuando la molécula efectora es un polímero, puede ser, en general, un polímero de origen sintético o natural, por ejemplo, un polímero de polialquileo, polialquilenilo o polioxialquileo de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado, por ejemplo un homopolisacárido o un heteropolisacárido.

Los sustituyentes opcionales específicos que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi.

Los ejemplos específicos de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido, poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados del mismo.

Los polímeros naturales específicos incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de los mismos.

"Derivados", tal como se usa en el presente documento, se pretende que incluya derivados reactivos, por ejemplo, grupos reactivos selectivos de tiol, tales como maleimidas y similares. El grupo reactivo puede estar unido directamente o a través de un segmento enlazador al polímero. Se apreciará que el residuo de dicho grupo en algunos casos formará parte del producto como grupo enlazador entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero puede variar según se desee, pero generalmente se encontrará en un intervalo de peso molecular promedio de 500 Da a 50000 Da, por ejemplo de 5000 a 40000 Da, tal como de 20000 a 40000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse en particular basándose en el uso previsto del producto, por ejemplo, la capacidad de ubicarse en determinados tejidos tales como tumores o de prolongar la semivida en circulación (para una revisión, véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Así, por ejemplo, cuando se pretende que el producto abandone la circulación y penetre en el tejido, por ejemplo para su uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso utilizar un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo con un peso molecular de aproximadamente 5000 Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso utilizar un polímero de mayor peso molecular, por ejemplo que tenga un peso molecular en el intervalo de 20000 Da a 40000 Da.

Los polímeros adecuados incluyen un polímero de polialquileno, tal como un poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado del mismo, y especialmente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 15000 Da a aproximadamente 40000 Da.

En un ejemplo, los anticuerpos para su uso en la presente invención se unen a restos de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG pueden unirse a través de cualquier grupo funcional de aminoácidos de cadena lateral o terminal disponible ubicado en el fragmento del anticuerpo, por ejemplo, cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Dichos aminoácidos pueden estar presentes de forma natural en el fragmento de anticuerpo o pueden introducirse en el fragmento utilizando procedimientos de ADN recombinante (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.219.996; US 5.667.425; WO98/25971). En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado en el que la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora. De forma adecuada, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o más residuos de cisteína a los que se puede unir la molécula efectora. Se pueden utilizar múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG.

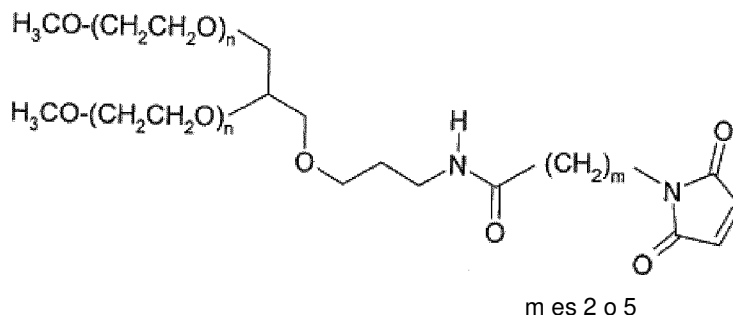
De forma adecuada, las moléculas de PEG están unidas covalentemente a través de un grupo tiol de por lo menos un residuo de cisteína ubicado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede unirse covalentemente al átomo de azufre de un residuo de cisteína ubicado en el fragmento. El enlace covalente generalmente será un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Si se utiliza un grupo tiol como punto de unión, se pueden utilizar moléculas efectoras activadas de forma apropiada, por ejemplo, derivados selectivos de tiol tales como maleimidas y derivados de cisteína. Se puede utilizar un polímero activado como material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpos modificados con polímeros tal como se ha descrito anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo con tiol, tal como un ácido o un éster  $\alpha$ -halocarboxílico, por ejemplo yodoacetamida, una imida, por ejemplo maleimida, una vinilsulfona o un disulfuro. Dichos materiales de partida pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo, de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, Estados Unidos) o pueden prepararse a partir de materiales de partida disponibles comercialmente utilizando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG particulares incluyen metoxi-PEG-amina 20K (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

En una forma de realización, el anticuerpo es un fragmento Fab o diFab modificado que está PEGilado, es decir se ha unido PEG (poli(etilenglicol)) covalentemente al mismo, por ejemplo, según el procedimiento descrito en el documento EP 0948544 o el documento EP1090037 [véase también "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York; Chapman, A. 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002, 54: 531-545]. En un ejemplo, el PEG está unido a una cisteína en la región bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab modificado con PEG tiene un grupo maleimida unido covalentemente a un único grupo tiol en una región bisagra modificada. Un residuo de lisina puede unirse covalentemente al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amina del resto de lisina puede unirse un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab puede ser, por lo tanto, de aproximadamente 40.000 Da.

En una forma de realización, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, que es un fragmento Fab modificado que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7 y que tiene en el extremo C-terminal de su cadena pesada una región bisagra modificada que contiene por lo menos un residuo de cisteína al que está unida una molécula efectora. De forma adecuada, la molécula efectora es PEG y se une utilizando los procedimientos descritos en los documentos WO98/25971 y WO2004072116 o en el documento WO2007/003898. De forma adecuada, la molécula efectora está unida de tal forma que un grupo lisil-maleimida esté unido al residuo de cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada, y cada grupo amino del resto lisilo se ha unido covalentemente a un residuo de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de

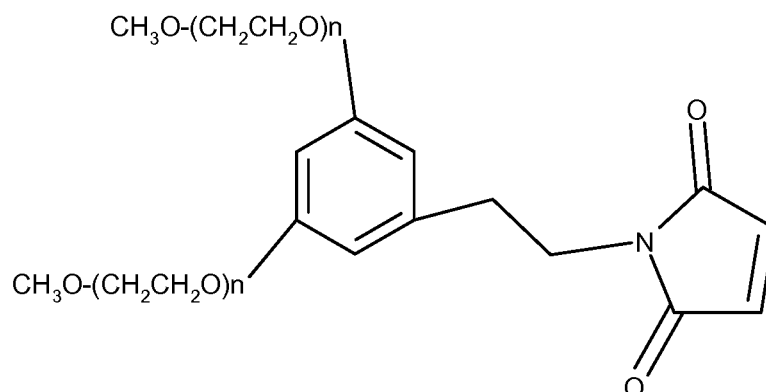
aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total del PEG unido al anticuerpo es, por lo tanto, de aproximadamente 40.000 Da. Las moléculas de PEG particulares incluyen 2-[3-(N-maleimido)propionamido]etilamida de lisina modificada con N,N'-bis(metoxipoli(etilenglicol) de peso molecular 20.000), también conocida como PEG2MAL40K (que se puede obtener de Nektar, anteriormente Shearwater).

Las fuentes alternativas de enlazadores de PEG incluyen NOF que suministra GL2-400MA2 (en la que m en la estructura inferior es 5) y GL2-400MA (en la que m es 2) y n es aproximadamente 450:



Es decir, cada PEG tiene aproximadamente 20.000 Da.

Otras moléculas efectoras de PEG alternativas del tipo siguiente:



están disponibles en Dr. Reddy, NOF y Jenkem.

En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo que está PEGilado (por ejemplo, con un PEG descrito en el presente documento), unido a través de un residuo de aminoácido cisteína al, o aproximadamente al, aminoácido 226 de la cadena, por ejemplo el aminoácido 226 de la cadena pesada (por numeración secuencial).

En una forma de realización, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, que es un fragmento Fab modificado que tiene una cadena pesada que comprende, o consiste en, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera que comprende, o consiste en, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 11 y que presenta una molécula efectora unida a la cisteína en la posición 226 de la cadena pesada (numeración lineal de la SEQ ID NO: 15). De forma adecuada, la molécula efectora es PEG y se une utilizando los procedimientos descritos en los documentos WO98/25971 y WO2004072116 o el documento WO2007/003898 y un grupo lisil-maleimida se une al residuo de cisteína en la posición 226 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 15), y cada grupo amino del residuo de lisilo se ha unido covalentemente a un residuo de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total del PEG unido al anticuerpo es, por lo tanto, de aproximadamente 40.000 Da. Las moléculas de PEG particulares incluyen 2-[3-(N-maleimido)propionamido]etilamida de lisina modificada con N,N'-bis(metoxipoli(etilenglicol) de peso molecular 20.000), también conocida como PEG2MAL40K (que se puede obtener de Nektar, anteriormente Shearwater). De forma adecuada, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab' modificado PEGilado tal como se muestra en la figura 2. Esta molécula PEGilada se denomina en el presente documento A26Fab'-PEG.

En otro ejemplo, las moléculas efectoras se pueden unir a fragmentos de anticuerpos utilizando los procedimientos descritos en las solicitudes WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171.

La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la(s) cadena(s) pesada y ligera de una molécula de anticuerpo de la presente invención. De forma adecuada, la secuencia de ADN codifica la

cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo de la presente invención. La secuencia de ADN de la presente invención puede comprender ADN sintético, por ejemplo producido mediante procesamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos. Las secuencias de ADN que codifican una molécula de anticuerpo de la presente invención pueden obtenerse mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican parte o la totalidad de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo pueden sintetizarse según se desee a partir de determinadas secuencias de ADN o sobre la base de las secuencias de aminoácidos correspondientes.

El ADN que codifica secuencias estructurales aceptoras está ampliamente disponible para los expertos en la técnica y se puede sintetizar fácilmente basándose en sus secuencias de aminoácidos conocidas.

Se pueden utilizar técnicas estándar de biología molecular para preparar secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas se pueden sintetizar completamente o parcialmente utilizando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Se pueden utilizar técnicas de mutagénesis dirigida al sitio y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según sea apropiado.

Se proporcionan ejemplos de secuencias adecuadas en la figura 1 (h) SEQ ID NO: 8; la figura 1 (i) SEQ ID NO: 10; la figura 1 (j) SEQ ID NO: 13; la figura 1 (k) SEQ ID NO: 14; la figura 1 (l) SEQ ID NO: 17 y la figura 1 (m) SEQ ID NO: 18. Los nucleótidos 1-63 de la SEQ ID NO: 18 y 1-63 de la SEQ ID NO: 14 codifican la secuencia peptídica señal de OmpA que se escinde para dar una molécula de anticuerpo antagonista de la presente invención (el péptido señal corresponde a los residuos de aminoácidos 1-21 de la figura 1 (g) SEQ ID NO: 16 y 1-21 de la figura 1 (e) SEQ ID NO: 12, respectivamente). La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención que comprende la SEQ ID NO: 18. La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena ligera de un anticuerpo de la presente invención que comprende la SEQ ID NO: 14.

La presente invención también se refiere a un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN de la presente invención. En consecuencia, se proporciona un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. De forma adecuada, el vector de clonación o de expresión comprende dos secuencias de ADN, que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de la molécula de anticuerpo de la presente invención, respectivamente. De forma adecuada, un vector según la presente invención comprende las secuencias dadas en la SEQ ID NO: 14 y la SEQ ID NO: 18. Los nucleótidos 1-63 de la SEQ ID NO: 18 y 1-63 de la SEQ ID NO: 14 codifican la secuencia del péptido señal de OmpA (residuos 1-21 de la SEQ ID NO: 16 y 1-21 de la SEQ ID NO: 12, respectivamente) que se escinde de la forma más adecuada para dar una molécula de anticuerpo neutralizante de la presente invención. En un ejemplo, el vector comprende una secuencia intergénica entre las cadenas pesada y ligera, tal como IGS2 (véase el documento WO03/048208). En consecuencia, en una forma de realización, el vector de la presente invención comprende la secuencia dada en la figura 1 (n) (SEQ ID NO: 19).

Los procedimientos generales mediante los cuales pueden construirse los vectores, procedimientos de transfección y procedimientos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. A este respecto, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, Nueva York y el Maniatis Manual producido por Cold Spring Harbor Publishing.

También se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores de clonación o de expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Se puede utilizar cualquier sistema vector/célula huésped adecuado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Pueden utilizarse sistemas bacterianos, por ejemplo, *E. coli*, y otros sistemas microbianos o también pueden utilizarse sistemas de expresión de célula huésped eucarióticos, por ejemplo, de mamíferos. Las células huésped de mamífero adecuadas incluyen células CHO, de mieloma o de hibridoma.

La presente invención también proporciona un proceso para la producción de una molécula de anticuerpo según la presente invención que comprende cultivar una célula huésped que contiene un vector de la presente invención en condiciones adecuadas para que se produzca la expresión de proteínas a partir del ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislar la molécula de anticuerpo.

La molécula de anticuerpo puede comprender únicamente un polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso solo se necesita utilizar una secuencia codificante de polipéptido de cadena pesada o cadena ligera para transfectar las células huésped. Para la producción de productos que comprenden tanto cadena pesada como cadena ligera, la línea celular puede transfectarse con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Como alternativa, se puede utilizar un solo vector, vector que incluye secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y cadena pesada.

Los anticuerpos y fragmentos según la presente divulgación se expresan a buenos niveles a partir de las células huésped. Por lo tanto, las propiedades de los anticuerpos y/o fragmentos están optimizadas y son propicias para el

procesamiento comercial.

Dado que los anticuerpos de la presente invención son útiles en el tratamiento y/o la prevención de una afección patológica, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende una molécula de anticuerpo de la presente invención en combinación con uno o más de entre un excipiente, un diluyente o un vehículo farmacéuticamente aceptables. En consecuencia, se proporciona el uso de un anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento. La composición se suministrará generalmente como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente un coadyuvante farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona un proceso para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende añadir y mezclar la molécula de anticuerpo de la presente invención conjuntamente con uno o más de entre un excipiente, un diluyente o un vehículo farmacéuticamente aceptables.

La molécula de anticuerpo puede ser el único ingrediente activo en la composición farmacéutica o de diagnóstico o puede ir acompañada de otros ingredientes activos que incluyen otros ingredientes de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, anti-IL-1 $\beta$ , anti-T, anti-IFN $\gamma$  o anti-LPS, o ingredientes que no son anticuerpos tales como xantinas. Otros ingredientes activos adecuados incluyen anticuerpos capaces de inducir tolerancia, por ejemplo, anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4.

En una forma de realización adicional, el anticuerpo, el fragmento o la composición según la divulgación se emplea en combinación con un agente farmacéuticamente activo adicional, por ejemplo, un corticosteroide (tal como propionato de fluticasona) y/o un agonista beta-2 (tal como salbutamol, salmeterol o formoterol) o inhibidores del crecimiento y la proliferación celular (tales como rapamicina, ciclofosfida, metotrexato) o un inhibidor de CD28 y/o CD40 alternativo. En una forma de realización, el inhibidor es una molécula pequeña. En otra forma de realización, el inhibidor es un anticuerpo específico para la diana.

Las composiciones farmacéuticas comprenden de forma adecuada una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección diana, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la cantidad terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente o bien en ensayos de cultivos celulares o bien en modelos animales, generalmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también se puede utilizar para determinar el intervalo de concentración apropiado y la vía de administración. Dicha información se puede utilizar para determinar las dosis y las vías de administración útiles en humanos.

La cantidad terapéuticamente eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, la combinación o las combinaciones de fármacos, la sensibilidad a la reacción y la tolerancia/la respuesta al tratamiento. Esta cantidad puede determinarse mediante experimentación rutinaria y se encuentra dentro del criterio del médico. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz será de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg, por ejemplo de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg. Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.

Las composiciones pueden administrarse individualmente a un paciente o pueden administrarse en combinación (por ejemplo, de forma simultánea, secuencial o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas.

La dosis a la que se administra la molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la afección que se va a tratar, la extensión de la inflamación presente y de si la molécula de anticuerpo se está usando preventivamente o para tratar una afección existente.

La frecuencia de la dosis dependerá de la semivida de la molécula de anticuerpo y de la duración de su efecto. Si la molécula de anticuerpo tiene una semivida corta (por ejemplo, de 2 a 10 horas) puede ser necesario administrar una o más dosis por día. Como alternativa, si la molécula de anticuerpo tiene una semivida larga (por ejemplo, de 2 a 15 días), puede ser necesario únicamente administrar una dosis una vez al día, una vez por semana o incluso una vez cada 1 o 2 meses.

El vehículo farmacéuticamente aceptable no deberá inducir por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y no deberá ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas víricas inactivas.

Se pueden utilizar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos,

malonatos y benzoatos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables para composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerina y etanol. Además, en dichas composiciones pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponadoras del pH. Dichos vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones densas y suspensiones, para su ingesta por el paciente.

Las formas adecuadas para administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo mediante inyección o infusión, por ejemplo mediante inyección en embolada o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede adquirir la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo oleoso o acuoso, y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para su reconstitución con un líquido estéril apropiado antes de su uso.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos que se van a tratar pueden ser animales. Sin embargo, en una o más formas de realización, las composiciones están adaptadas para su administración a sujetos humanos.

De forma adecuada, en formulaciones según la presente divulgación, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoelectrico del anticuerpo o el fragmento; por ejemplo, si el pH de la formulación es 7, entonces un pH de 8-9 o superior puede ser apropiado. Aunque no se desea vincularse a ninguna teoría, se piensa que esto puede proporcionar en última instancia una formulación final con una estabilidad mejorada, por ejemplo, el anticuerpo o el fragmento permanece en solución.

En una forma de realización, la formulación farmacéutica a un pH en el intervalo de 4,0 a 7,0 comprende: 1 a 200 mg/ml de un anticuerpo según la presente divulgación, 1 a 100 mM de un tampón, del 0,001 al 1 % de un tensioactivo, a) de 10 a 500 mM de un estabilizante, b) de 10 a 500 mM de un estabilizante y de 5 a 500 mM de un agente de tonicidad, o c) de 5 a 500 mM de un agente de tonicidad.

Por ejemplo, la formulación a aproximadamente pH 6 puede comprender de 1 a 50 mg/ml de anticuerpo, 20 mM de L-histadina HCl, 240 mM de trehalosa y el 0,02 % de polisorbato 20. Como alternativa, una formulación a aproximadamente un pH de 5,5 puede comprender de 1 a 50 mg/ml de anticuerpo, 20 mM de tampón de citrato, 240 mM de sacarosa, 20 mM de arginina y el 0,02 % de polisorbato 20.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por medio de cualquier serie de vías que incluyen, pero sin limitación, la vía oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase el documento WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También se pueden utilizar inyectores de chorro (*hyposprays*) para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas pueden prepararse como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o como suspensiones. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección.

La administración directa de las composiciones generalmente se llevará a cabo mediante inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se administrará al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar en una lesión. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de múltiples dosis.

Se apreciará que el ingrediente activo de la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible a la degradación en el aparato gastrointestinal. Por lo tanto, si la composición se va a administrar por una vía que utiliza el aparato gastrointestinal, la composición deberá contener agentes que protejan al anticuerpo contra la degradación, pero que liberen el anticuerpo una vez que se haya absorbido del aparato gastrointestinal.

Una discusión completa sobre vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

En una forma de realización, la formulación se proporciona como una formulación para administraciones tópicas que incluyen inhalación.

Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles dosificadores que contienen gases propulsores o soluciones inhalables exentas de gases propulsores. Los polvos inhalables según la descripción que contienen la sustancia activa pueden consistir únicamente en las sustancias activas mencionadas anteriormente o en una mezcla de las sustancias activas mencionadas anteriormente con un excipiente fisiológicamente aceptable.

Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (por ejemplo, glucosa o arabinosa), disacáridos (por ejemplo,

lactosa, sacarosa, maltosa), oligosacáridos y polisacáridos (por ejemplo, dextranos), alcoholes polihidroxílicos (por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo, cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de los mismos entre sí. Se usan, de forma adecuada, monosacáridos o disacáridos, y se usa lactosa o glucosa, particularmente pero no exclusivamente, en forma de sus hidratos.

5

Las partículas para su deposición en el pulmón requieren un tamaño de partícula inferior a 10 micrómetros, tal como 1-9 micrómetros, por ejemplo, de 0,1 a 5 µm, en particular de 1 a 5 µm. El tamaño de partícula del ingrediente activo (tal como el anticuerpo o el fragmento) es de una importancia capital.

10 Los gases propulsores que se pueden utilizar para preparar los aerosoles inhalables son conocidos en la técnica. Los gases propulsores adecuados se seleccionan de entre hidrocarburos tales como n-propano, n-butano o isobutano y halohidrocarburos tales como derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propulsores mencionados anteriormente se pueden utilizar solos o en mezclas de los mismos.

15

Los gases propulsores particularmente adecuados son derivados de alcanos halogenados seleccionados de entre TG 11, TG 12, TG 134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados mencionados anteriormente, el TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y el TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y sus mezclas son particularmente adecuados.

20

Los aerosoles inhalables que contienen gas propulsor también pueden contener otros ingredientes tales como codisolventes, estabilizantes, agentes con actividad de superficie (tensioactivos), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes son conocidos en la técnica.

25 Los aerosoles inhalables que contienen gas propulsor según la invención pueden contener hasta el 5 % en peso de sustancia activa. Los aerosoles según la invención contienen, por ejemplo, del 0,002 al 5 % en peso, del 0,01 al 3 % en peso, del 0,015 al 2 % en peso, del 0,1 al 2 % en peso, del 0,5 al 2 % en peso o del 0,5 al 1 % en peso de ingrediente activo.

30 Alternativamente, las administraciones tópicas al pulmón también pueden producirse mediante la administración de una formulación líquida en solución o en suspensión, por ejemplo utilizando un dispositivo tal como un nebulizador, por ejemplo, un nebulizador conectado a un compresor (por ejemplo, el nebulizador Pari LC-Jet Plus(R) conectado a un compresor Pari Master(R) fabricado por Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

35 El anticuerpo de la invención se puede administrar dispersado en un disolvente, por ejemplo, en forma de una solución o una suspensión. Puede suspenderse en una solución fisiológica adecuada, por ejemplo, una solución salina u otro disolvente farmacológicamente aceptable o una solución tamponada. Las soluciones tamponadas conocidas en la técnica pueden contener de 0,05 mg a 0,15 mg de edetato disódico, de 8,0 mg a 9,0 mg de NaCl, de 0,15 mg a 0,25 mg de polisorbato, de 0,25 mg a 0,30 mg de ácido cítrico anhidro y de 0,45 mg a 0,55 mg de citrato de sodio por 1 ml de agua a fin de alcanzar un pH de aproximadamente 4,0 a 5,0. Una suspensión puede utilizar, por  
40 ejemplo, un anticuerpo liofilizado.

Las suspensiones o formulaciones en solución terapéuticas también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes son bien conocidos en la técnica e incluyen tampones (por ejemplo, tampón de citrato, tampón de fosfato, tampón de acetato y tampón de bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por ejemplo, seroalbúmina), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol y glicerina. Las soluciones o las suspensiones se pueden encapsular en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación, generalmente, se proporcionará en una forma sustancialmente estéril empleando procesos de fabricación estériles.

50 Esto puede incluir la producción y la esterilización por filtración del disolvente/la solución tamponados utilizados para la formulación, la suspensión aséptica del anticuerpo en la solución de disolvente tamponado estéril y la distribución de la formulación en recipientes estériles mediante procedimientos familiares para los expertos en la técnica. .

La formulación nebulizable según la presente divulgación puede proporcionarse, por ejemplo, en forma de unidades de monodosis (por ejemplo, recipientes de plástico sellados o viales) envasados en sobres de papel de aluminio. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen, por ejemplo, 2 ml, de disolvente/solución tamponadora.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser adecuados para la administración mediante nebulización.

60

También está previsto que el anticuerpo de la presente invención se pueda administrar mediante el uso de tratamiento génico. Para lograr esto, las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesada y ligera de la molécula de anticuerpo bajo el control de los componentes de ADN apropiados se introducen en un paciente de tal manera que las cadenas del anticuerpo se expresen a partir de las secuencias de ADN y se ensamblen *in situ*.

65

La presente invención también proporciona una molécula de anticuerpo (o composiciones que la comprenden) para

su uso en el control de enfermedades inflamatorias, por ejemplo, enfermedad inflamatoria aguda o crónica. De forma adecuada, la molécula de anticuerpo (o composiciones que la comprenden) se puede usar para reducir el proceso inflamatorio o para prevenir el proceso inflamatorio. En una forma de realización, se proporciona una reducción *in vivo* de las células T activadas, en particular aquellas involucradas en respuestas inmunitarias inflamatorias inapropiadas, por ejemplo, captadas en la vecindad/la ubicación de dicha respuesta.

La reducción de células T activadas, tal como se utiliza en este documento, puede ser una reducción del 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o más por ciento en comparación con antes del tratamiento o con la ausencia de tratamiento. Ventajosamente, el tratamiento con un anticuerpo, fragmento o composición según la presente invención puede permitir una reducción en el nivel de células T activadas, sin reducir el nivel general de células T (células T inactivadas) de los pacientes. Esto puede tener como consecuencia menos efectos secundarios y posiblemente evitar el agotamiento de las células T en el paciente.

La presente invención también proporciona la molécula de anticuerpo de la presente invención para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno patológico que está mediado por OX40 o asociado a un nivel aumentado de OX40. La afección patológica puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en infecciones (víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias), choque endotóxico asociado con infección, artritis, artritis reumatoide, asma, EPOC, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad del intestino inflamatorio, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad pilonidal, peritonitis, psoriasis, vasculitis, adhesiones quirúrgicas, apoplejía, diabetes de tipo I, enfermedad de Lyme, artritis, meningoencefalitis, uveitis autoinmunitaria, trastornos inflamatorios mediados por el sistema inmunitario del sistema nervioso central y periférico, tales como esclerosis múltiple, lupus (como lupus eritematoso sistémico) y síndrome de Guillain-Barré, dermatitis atópica, hepatitis autoinmunitaria, alveolitis fibrosa, enfermedad de Grave, nefropatía por IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Meniere, pénfigo, cirrosis biliar, sarcoidosis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, otros trastornos autoinmunitarios, pancreatitis, traumatismo (cirugía), enfermedad de injerto frente a huésped, rechazo del trasplante, enfermedad cardíaca que incluye enfermedades isquémicas tales como infarto de miocardio, así como arterioesclerosis, coagulación intravascular, reabsorción ósea, osteoporosis, osteoartritis, periodontitis e hipoclorhidria.

En una forma de realización, el anticuerpo según la invención se emplea en el tratamiento de alergia, EPOC, enfermedad autoinmunitaria o artritis reumatoide.

La presente descripción también proporciona una molécula de anticuerpo según la presente invención para su uso en el tratamiento o la prevención del dolor, en particular del dolor asociado con inflamación.

La presente invención proporciona además el uso de una molécula, un fragmento o una composición de anticuerpo según la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno patológico que está mediado por OX40 o asociado a un nivel aumentado de OX40, en particular el trastorno patológico es artritis reumatoide, asma o EPOC.

La presente invención proporciona además el uso de una molécula, un fragmento o una composición de anticuerpo según la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una o más de las indicaciones médicas descritas en el presente documento.

Se puede utilizar una molécula, un fragmento o una composición de anticuerpo de la presente invención en cualquier tratamiento en el que se desee reducir los efectos de OX40 en el cuerpo humano o animal. El OX40 puede encontrarse en circulación en el cuerpo o puede estar presente en un nivel indeseablemente elevado localizado en un sitio particular del cuerpo, por ejemplo, un sitio de inflamación.

En una forma de realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención o una composición que comprende la misma se usa para el control de una enfermedad inflamatoria, por ejemplo tal como se describe en el presente documento.

La presente invención también proporciona una composición para su uso en un procedimiento de tratamiento de sujetos humanos o animales que padecen o están en riesgo de padecer un trastorno mediado por OX40, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad eficaz de la molécula de anticuerpo de la presente invención, o una composición que comprende la misma.

En una forma de realización, se proporciona un proceso para purificar un anticuerpo (en particular un anticuerpo o un fragmento según la invención) que comprende las etapas siguientes: realizar una cromatografía de intercambio aniónico en modo no de unión de tal forma que las impurezas se retengan en la columna y el anticuerpo se eluya.

Las resinas de intercambio iónico adecuadas para su uso en el proceso incluyen la resina Q.FF (suministrada por GE-Healthcare). La etapa puede realizarse, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 8.

El proceso puede comprender además una etapa de captura inicial utilizando cromatografía de intercambio catiónico,

que se realiza, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 4 a 5, tal como 4,5. La cromatografía de intercambio catiónico puede utilizar, por ejemplo, una resina tal como la resina CaptoS o SP sefarosa FF (suministrada por GE-Healthcare). El anticuerpo o el fragmento puede eluirse después de la resina utilizando una solución de sal iónica tal como cloruro de sodio, por ejemplo a una concentración de 200 mM.

Por lo tanto, la etapa o las etapas cromatográficas pueden incluir una o más etapas de lavado, según sea apropiado.

El proceso de purificación también puede comprender una o más etapas de filtración, tales como una etapa de diafiltración.

Se cree que un  $PI$  superior a 8, tal como 8,5, 8,6, 8,7, 8,8 o 9,0 del anticuerpo o el fragmento ayuda a la purificación para proporcionar el anticuerpo o el fragmento "exento" o "sustancialmente exento" de impurezas, tales como endotoxina, ADN y proteínas de la célula huésped.

Así, en una forma de realización se proporciona un anticuerpo o un fragmento para OX40 purificado, por ejemplo un anticuerpo o un fragmento humanizado, en particular un anticuerpo o un fragmento según la invención, sustancialmente purificado de, en particular exento o sustancialmente exento de, endotoxinas y/o proteína o ADN de la célula huésped.

Se pretende que forma purificada, tal como se ha utilizado anteriormente, ser refiera a por lo menos el 90 % de pureza, tal como el 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % p/p o más de pureza.

Se pretende que sustancialmente exento de endotoxinas se refiera, en general, a un contenido de endotoxinas de 1 EU por mg de producto de anticuerpo o menos, tal como 0,5 o 0,1 EU por mg de producto.

Se pretende que sustancialmente exento de proteína o ADN de la célula huésped se refiera, en general, a un contenido de proteína y/o ADN de la célula huésped de 400  $\mu$ g por mg de producto de anticuerpo o menos, tal como 100  $\mu$ g por mg o menos, en particular 20  $\mu$ g por mg, según sea apropiado.

La molécula de anticuerpo de la presente invención también se puede utilizar en diagnóstico, por ejemplo en diagnóstico *in vivo* y en la toma de imágenes de estados patológicos relacionados con OX40.

Se pretende que comprender, en el contexto de la presente memoria descriptiva, signifique incluir.

Cuando sea técnicamente apropiado, se pueden combinar formas de realización de la invención.

Las formas de realización se describen en el presente documento de forma que comprendan determinadas características/elementos. La divulgación también se extiende a formas de realización separadas que consisten o consisten esencialmente en dichas características/dichos elementos.

La presente invención se describe adicionalmente solo a modo de ilustración en los ejemplos siguientes, que se refieren a las figuras adjuntas, en las que:

## EJEMPLOS

### Figura 1 en detalle:

- a) Región V de la cadena ligera del anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 7)
- b) Región V de la cadena pesada del anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 9)
- c) CDRH1 (SEQ ID NO: 1), CDRH2 (SEQ ID NO: 2), CDRH3 (SEQ ID NO: 3), CDRL1 (SEQ ID NO: 4), CDRL2 (SEQ ID NO: 5), CDRL3 (SEQ ID NO: 6) del anticuerpo A26) y CDRH2 (SEQ ID NO: 20) y CDRL1 (SEQ ID NO: 21) del anticuerpo CA044\_00026.
- d) Cadena ligera del anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 11)
- e) Cadena ligera del anticuerpo A26, incluida la secuencia señal (subrayada) (SEQ ID NO: 12)
- f) Cadena pesada del anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 15)
- g) Cadena pesada del anticuerpo A26, incluida la secuencia señal (subrayada) (SEQ ID NO: 16)
- h) ADN que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 8)
- i) ADN que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 10)

j) ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 13)

k) ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo A26, incluida la secuencia señal (SEQ ID NO: 14)

l) ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 17)

m) ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo A26, incluida la secuencia señal (SEQ ID NO: 18)

n) ADN que codifica las cadenas pesada y ligera del anticuerpo A26, incluidas las secuencias señal y la secuencia intergénica IGS2 (SEQ ID NO: 19).

### **Manipulaciones de ADN y procedimientos generales**

Se utilizó la cepa INVaF' de *E. coli* (Invitrogen) para la transformación y el crecimiento en un cultivo rutinario. Se obtuvieron enzimas de restricción y de modificación del ADN de Roche Diagnostics Ltd. y New England Biolabs. Se realizaron preparaciones de plásmidos utilizando kits de purificación Maxi Plasmid (QIAGEN, número de catálogo 12165). Las reacciones de secuenciación de ADN se realizaron utilizando el kit de secuenciación terminador ABI Prism Big Dye (número de catálogo 4304149) y se llevaron a cabo en un secuenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). Los datos se analizaron utilizando el programa AutoAssembler (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos se obtuvieron de Invitrogen. Los genes que codifican secuencias iniciales de la región V se diseñaron y construyeron mediante un enfoque de síntesis automatizado por Entelechon GmbH, y se modificaron para generar las versiones injertadas por mutagénesis dirigida por oligonucleótidos. La concentración de Fab' se determinó utilizando un ELISA de ensamblaje de Fab'.

### **Ejemplo 1: Producción y humanización de un anticuerpo anti-OX40 neutralizante A26.**

Se inmunizaron ratas Sprague Dawley hembra con proteína de fusión recombinante de OX40 humano y mFc. El anticuerpo CA044\_00026 que se une al OX-40 humano se aisló utilizando los procedimientos descritos en el documento WO92/02551. Los genes para el dominio variable de la cadena pesada (VH) y el dominio variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo CA044\_00026 se aislaron y se secuenciaron después de la clonación mediante PCR de transcripción inversa.

Se diseñaron una serie de regiones VL y VH humanizadas utilizando marcos estructurales aceptores de la región V humana y variando el número de residuos donantes en las regiones estructurales. Se diseñaron dos regiones VH injertadas (gH1 y 2) y 8 regiones VL injertadas (gL1-8) y los genes se construyeron mediante ensamblaje de oligonucleótidos y mutagénesis por PCR.

Se construyeron fragmentos Fab' de anticuerpo para cada injerto utilizando los genes que codifican los dominios variables humanizados que se subclonaron en el vector de expresión de *E. coli* pTTOD, que contiene el ADN que codifica el dominio CH1 de la cadena pesada Cy1 humana (alotipo G1m17) y el dominio constante de la cadena ligera C kappa humana (alotipo K1m3) (tal como se ha descrito previamente en el documento WO03/048208). La región bisagra se trunca y se modifica, lo que consiste en el cambio de secuencia de Cys-Pro-Pro-Cys a Cys-Ala-Ala para generar una región bisagra con un único residuo de cisteína disponible para la unión específica de sitio de un resto PEG (véase el ejemplo 2).

Las secuencias que codifican el péptido señal de OmpA se unieron al extremo 5' de los genes que codifican las cadenas tanto pesada como ligera. Durante la expresión, las secuencias de señal dirigen el transporte de cada polipéptido al periplasma bacteriano. Tras la translocación a través de la membrana celular, la secuencia señal se escinde, dejando las cadenas pesada y ligera de Fab' maduras.

El vector pTTOD que contiene cada injerto se transformó en la cepa huésped de *E. coli* K12 W3110 y los fragmentos Fab' del anticuerpo se produjeron en *E. coli* mediante cultivo de alta densidad celular utilizando procedimientos estándar. Los anticuerpos se purificaron utilizando intercambio catiónico seguido de cromatografía de intercambio aniónico utilizando procedimientos estándar (Humphreys *et al.*, 2002, Protein Expression and Purification, 26, 309-320).

Los diversos fragmentos Fab' producidos se analizaron con respecto a la unión y el bloqueo que se describen más adelante en el presente documento y cada uno se evaluó en términos de su expresión en *E. coli*, su potencia en relación con el anticuerpo parental y su idoneidad para la purificación y el procesamiento posterior. Esto condujo a la selección del injerto gL8gH2 que se denominó A26. Las secuencias de la región V de este injerto se muestran en la figura 1 (a) y (b) y en las SEQ ID NO: 7 y 9 para la cadena ligera (gL2) y la cadena pesada (gH2), respectivamente.

El marco estructural aceptor de la cadena pesada es la secuencia de línea germinal humana VH3 1-3 3-07 con el marco estructural 4 proveniente de esta porción de línea germinal de la región JH humana JH4. El marco estructural aceptor de la cadena ligera es la secuencia de línea germinal humana VK1 2-1 1-02, con el marco estructural 4

proveniente de esta porción de línea germinal de la región JK humana JK4. Los aminoácidos de las posiciones 37, 73, 78 y 94 (numeración de Kabat) de la cadena pesada de SEQ ID NO: 9 son residuos donantes (del anticuerpo parental) que se encontró que eran esenciales para la retención de la potencia total. El residuo 64 de CDRH2 se convirtió de glutamato donante a lisina aceptora (E64K) para crear una molécula con un pI más elevado, más favorable para la purificación por intercambio iónico. Los aminoácidos de las posiciones 64 y 71 (numeración de Kabat) de la cadena ligera de SEQ ID NO: 7 son residuos donantes que se encontró que eran esenciales para la retención de la potencia total. Los residuos 27 y 28 de CDR-L1 se convirtieron de glutamato y aspartato donantes a glutamina (E27Q) y serina (D28S) aceptoras para crear una molécula con un pI más elevado, más favorable para la purificación por intercambio iónico.

Las CDR de este anticuerpo se muestran en la figura 1 (c), al igual que la CDRH2 (SEQ ID NO: 20) y la CDRL1 (SEQ ID NO: 21) originales que están sin modificar. Las cadenas ligera y pesada de longitud completa se muestran en las figuras 1 (d) y (f), respectivamente.

Los genes gL8 y gH2 se rediseñaron al nivel de ADN que contenía codones para las regiones variables y constantes optimizadas para la expresión en *E. coli* y se expresaron en el vector pTTOD (Fab') tal como se ha descrito anteriormente. Las secuencias de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada se muestran en las figuras 1 (k), SEQ ID NO: 14 y (m) SEQ ID NO: 18, respectivamente.

La secuencia de proteínas de este Fab' (incluidas las regiones constantes) se proporcionan en las SEQ ID NO: 11 y 12 (cadena ligera sin y con péptido señal de OmpA) y las SEQ ID NO: 15 y 16 (cadena pesada sin y con péptido señal de OmpA). El vector de expresión dicistrónico pTTOD (A26 IGS2) incluye la secuencia proporcionada en la figura 1 (n) y la SEQ ID NO: 19. La secuencia contiene una secuencia intergénica, IGS2, entre los genes de las cadenas ligera y pesada (véase el documento WO03/048208) y la secuencia líder de OmpA al comienzo de los genes de las cadenas ligera y pesada.

### **Ejemplo 2: Producción de A26Fab'-PEG**

El fragmento de Fab' A26 producido en *E. coli* y purificado tal como se describe en el ejemplo 1 se PEGiló según los procedimientos descritos en el documento WO2007/003898.

El PEG se unió a la cisteína de bisagra en la posición 226 (numeración lineal) de la cadena pesada (SEQ ID NO: 15) de forma que un grupo lisil-maleimida se unió al residuo de cisteína en la posición 226 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 15), y cada grupo amino del resto de lisilo se ha unido covalentemente a un residuo de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total del PEG unido al anticuerpo fue, por lo tanto, de aproximadamente 40.000 Da, tal como se muestra en la figura 2.

### **Ejemplo 3: Evaluación de la afinidad de A26 y A26Fab'-PEG por OX40**

La tecnología BIAcore supervisa la unión entre biomoléculas en tiempo real y sin el requerimiento de un marcado. Uno de los elementos que interacciona, denominado el ligando, o bien se inmoviliza directamente o bien se captura en la superficie inmovilizada, mientras que el otro, denominado el analito, fluye en solución sobre la superficie capturada. El sensor detecta el cambio de masa en la superficie del sensor cuando el analito se une al ligando para formar un complejo en la superficie. Esto corresponde al proceso de asociación. La disociación del analito del ligando se supervisa cuando el analito se reemplaza por un tampón. En el ensayo de afinidad BIAcore, el ligando es el anticuerpo que se está analizando y el analito es OX40 humano.

Instrumento: Biacore® 3000, Biacore AB, Uppsala, Suecia.

Chip sensor: CM5 (grado de investigación) Número de catálogo: BR-1001-14, Biacore AB, Uppsala, Suecia. Los chips se almacenaron a 4 °C.

Kit de acoplamiento de amina: Número de catálogo: BR-1000-50, Biacore AB, Uppsala, Suecia.

Clorhidrato de etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Preparado hasta 75 mg/ml en agua destilada y almacenado en partes alícuotas de 200 µl a -70 °C.

N-Hidroxisuccinimida (NHS). Preparada hasta 11,5 mg/ml en agua destilada y almacenada en partes alícuotas de 200 µl a -70 °C.

Clorhidrato de etanolamina 1 M-NaOH, pH 8,5. Almacenado en partes alícuotas de 200 µl a -70 °C.

Tampones: Tampón de procesamiento: HBS-EP (que es HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %). Número de catálogo: BR-1001-88, Biacore AB, Uppsala, Suecia. Tampón almacenado a 4 °C.

Tampón de inmovilización: Acetato 5,0 (que es acetato de sodio 10 mM, pH 5,0). Número de catálogo: BR-1003-51, Biacore AB, Uppsala, Suecia. Tampón almacenado a 4 °C.

Captura de ligando: fragmento F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-IgG humana Affinipure, fragmento F(ab')<sub>2</sub> específico. Jackson ImmunoResearch Inc (Pennsylvania, Estados Unidos) Número de catálogo: 109-006-097.

Reactivo almacenado a 4 °C.

Ligando: Anticuerpos A26 y A26Fab'-PEG, almacenados a 4 °C.

Analito: El dominio extracelular OX40 humano (185 aa) fusionado con el Fc de IgG2a murino (232 aa). (0,5 mg/ml, Ancell N° 513-020 lote 142805), almacenado a 4 °C.

Solución de regeneración: HCl 40 mM preparado mediante dilución con agua destilada a partir de una solución madre 11,6 M (BDH, Poole, Inglaterra. Número de catálogo: 101254H).

NaOH 5 mM preparado mediante dilución con agua destilada a partir de una solución madre 50 mM.

Número de catálogo: BR-1003-58, Biacore AB, Uppsala, Suecia.

Procedimiento de ensayo: El formato del ensayo fue la captura del anticuerpo por F(ab')<sub>2</sub> anti-humano inmovilizado, después la valoración del dominio extracelular humano OX40 sobre la superficie capturada.

A continuación se muestra un ejemplo del procedimiento:

Se realizó un BIA (análisis de interacción biomolecular) utilizando un BIAcore 3000 (BIAcore AB). El fragmento F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-IgG humana Affinipure, fragmento F(ab')<sub>2</sub> específico (Jackson ImmunoResearch) se inmovilizó en un chip sensor CM5 por medio de química de acoplamiento de amina a un nivel de captura de ≈4000 unidades de respuesta (UR). El tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, BIAcore AB) se utilizó como tampón de procesamiento a un caudal de 10 µl/min. Se utilizó una inyección de 10 µl de Fab' a 0,5 µg/ml o Fab'-PEG a 50 µg/ml para la captura por el F(ab')<sub>2</sub> anti-IgG humana inmovilizado. El OX40 humano se valoró con respecto al anticuerpo capturado a diversas concentraciones (25 nM a 0,78 nM) a un caudal de 30 µl/min. La superficie se regeneró mediante una inyección de 10 µl de HCl 40 mM, seguida de una inyección de 5 µl de NaOH 5 mM a un caudal de 10 µl/min.

Las curvas de unión con sustracción de fondo se analizaron utilizando el programa informático de evaluación BIA (versión 3.2) siguiendo procedimientos estándar. Los parámetros cinéticos se determinaron a partir del algoritmo de ajuste.

El valor de afinidad determinado para A26 se encontraba en el intervalo de 19-45,4 pM y para A26Fab'-PEG se encontraba en el intervalo de 13,7-50,3 pM.

La tabla siguiente muestra datos replicados para el fragmento Fab humanizado no PEGilado A26 (fab\*) y el fragmento Fab A26Fab'-PEG (Fab-PEG \*\*), que se une a OX40 humano:

**Tabla 1**

| Muestra   | ka(1/Ms)        | Kd(1/s)          | KD(M)    | KD(pM) |
|-----------|-----------------|------------------|----------|--------|
| Fab*      | 4,86 ± 1,6 E+05 | 1,29 ± 0,07 E-05 | 2,96E-11 | 29,6   |
| Fab-PEG** | 4,76 ± 2,1 E+05 | 1,30 ± 0,46 E-05 | 3,13E-11 | 31,3   |

\* promedio de 5 determinaciones, \*\* promedio de 4 determinaciones

### **Ejemplo 3a: Afinidad basada en células y capacidad de bloqueo de ligandos de A26Fab'-PEG**

#### ***Afinidad basada en células***

Para determinar la afinidad de A26Fab'-PEG por antígeno expresado en la *superficie celular*, se realizaron experimentos de unión de saturación utilizando células T CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> activadas y anticuerpo marcado con FITC. La unión específica del anticuerpo al receptor *en equilibrio* a lo largo de un intervalo de concentraciones de ligando se utilizó para determinar K<sub>D</sub>, asumiendo que solo una fracción muy pequeña de anticuerpo estaba unida al receptor en cualquier punto de la curva de unión.

La unión de equilibrio se describe mediante la ecuación siguiente:



La velocidad de asociación de anticuerpo con receptor =  $k_{\text{asoc}} \times [\text{Receptor}_{\text{libre}}] \times [\text{Anticuerpo}_{\text{libre}}]$

5 La velocidad de disociación del complejo receptor-anticuerpo =  $k_{\text{disoc}} \times [\text{Receptor-Anticuerpo}]$

En el equilibrio, las velocidades de asociación y disociación son iguales y se puede derivar una ecuación que describe la isoterma de unión; en un gráfico semi-logarítmico la unión es sigmoidal. La  $K_D$  se define por  $k_{\text{disoc}}/k_{\text{asoc}}$  y puede calcularse a partir de la curva de unión como la concentración a la que se produce la unión semimáxima.

10 La unión de A26Fab'-PEG marcado con FITC a células T CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> humanas se midió mediante citometría de flujo a lo largo de un intervalo de concentración 4-log. En la figura 3 se muestra una curva de unión representativa para A26Fab'-PEG. Los valores de  $K_D$  obtenidos en células activadas de 3 donantes diferentes fueron 1,193 nM, 1,071 nM y 1,055 nM.

15 La  $K_D$  basada en células de A26Fab'-PEG (media 1,106 nM) es significativamente más débil que la unión a OX40 recombinante medida mediante BIAcore (31,3 pM). Esto podría ser debido a una serie de factores. El A26Fab'-PEG puede tener una mayor afinidad por OX40 recombinante expresado como una proteína de fusión Fc dimérica, que tiene una estructura terciaria y cuaternaria diferente a la del OX40 expresado en la superficie de una célula nativa, predicha para asociarse como un trímero no covalente en la membrana celular (Chan *et al.*, 2000). Además, la afinidad puede verse alterada por la glicosilación diferencial de OX40 recombinante frente a OX40 nativo. El entorno tridimensional de la membrana celular, tal como convoluciones de membrana y proteínas colocalizadas, también puede proporcionar un impedimento estérico, que limita la accesibilidad de OX40 a A26Fab'-PEG. En consecuencia, la afinidad basada en células probablemente representa una medida más próxima a la verdadera afinidad del fármaco *in vivo*.

#### **Procedimientos: Unión de A26Fab'-PEG a células T CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> activadas humanas**

30 Se aislaron PBMC mediante separación en un gradiente de Ficoll y se activaron con 1 µg/ml de PHA-L durante 3 días a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, 100 % de humedad. Se aislaron células T CD4<sup>+</sup> mediante selección negativa utilizando perlas magnéticas (Kit II de aislamiento de células T CD4<sup>+</sup> para humanos; Miltenyi Biotec). Se incubaron aproximadamente  $1,2 \times 10^5$  células en presencia de anticuerpo (intervalo de concentración final 10 µg/ml - 0,0006 µg/ml (111 nM - 0,0068 nM)) durante 2 horas en hielo. Las células se lavaron antes del análisis mediante citometría de flujo utilizando un FACScalibur (Becton Dickinson). Se produjeron dos curvas de valoración, una con A26Fab'-PEG y una segunda con gA33 Fab'-PEG como control de unión no específica. Se utilizó un análisis de regresión lineal para sustraer la unión no específica y la curva de unión específica así generada se analizó mediante regresión no lineal (Graphpad Prism®) para determinar  $K_D$ .

#### **Ejemplo 3b: capacidad de bloqueo de ligandos**

40 La capacidad de A26Fab'-PEG para bloquear la interacción entre OX40 expresado en la superficie celular y OX40L recombinante se midió utilizando un ensayo de bloqueo de ligandos basado en citometría de flujo. Brevemente, se preincubaron células T CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> activadas humanas con una valoración de A26Fab'-PEG. Subsiguientemente, se añadió OX40L recombinante a las células y se dejó que se uniera en presencia de A26 Fab'-PEG. La proporción de OX40L unido se detectó a continuación mediante citometría de flujo utilizando un reactivo secundario marcado. La figura 4 muestra una curva de inhibición representativa y demuestra que el A26Fab'-PEG es capaz de bloquear completamente la unión de OX40L. La  $CI_{50}$  media para la inhibición de la unión de OX40L recombinante fue 4,1 nM ( $n = 2$  donantes).

50 **Procedimientos: Inhibición de la unión de OX40L a células T CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> humanas activadas mediante A26Fab'-PEG.** Se aislaron PBMC por separación en un gradiente de Ficoll y se activaron con 1 µg/ml de PHA-L durante 3 días a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, 100 % de humedad. Se incubaron  $2,5 \times 10^5$  células en presencia de anticuerpo (intervalo de concentración final 20 µg/ml - 0,0003 µg/ml (229 nM - 0,0035 nM)) durante 10 minutos en hielo. Se añadió OX40L (CD252 muCD8 biotinilado, Ancell) a una concentración final de 2 µg/ml y se incubó durante 30 minutos adicionales en hielo. Las células se lavaron y la unión de OX40L se detectó mediante incubación con estreptavidina marcada con PE (Jackson Immunoresearch) antes del análisis por citometría de flujo utilizando un FACScalibur (Becton Dickinson). Se utilizó gA33 Fab'-PEG como control no específico. La curva de inhibición se analizó mediante regresión no lineal (Graphpad Prism®) para determinar la  $CI_{50}$ . Los datos mostrados son de un donante representativo de dos.

#### **Ejemplo 4: Potencia de A26Fab'-PEG en ensayos funcionales humanos**

Para evaluar su potencia en el bloqueo de la unión endógena OX40-OX40L durante interacciones celulares, se analizó A26 Fab'-PEG en un intervalo de respuestas de células T humanas dirigidas por antígeno.

#### Ejemplo 4a: Reacción de linfocitos mixtos

Desarrollado por primera vez en 1964 (Bach *et al.*, 1964, Science 143, 813-814) la reacción de linfocitos mixtos (MLR) alogénicos es un modelo *in vitro* de activación y proliferación de células T alorreactivas (O'Flaherty *et al.*, 2000, Immunology, 100, 289-299), utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) completas de dos donantes no relacionados. Las células T donantes se activan mediante el reconocimiento de antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) alogénicos en PBMC estimuladoras donantes no relacionadas, lo que da como resultado la proliferación celular y la producción de citocinas (Lukacs *et al.*, 1993, Am J Pathology, 143, 1179-1188). Se ha demostrado que la alorreacción de linfocitos T está dirigida tanto por el antígeno MHC alogénico como por el péptido unido (Sherman *et al.*, 1993, Annu. Rev. Immunol, 11, 385-402), lo que sugiere que una respuesta de MLR puede ser tanto contra los antígenos MHC alogénicos estimuladores como contra los péptidos unidos. La magnitud de una respuesta de MLR se correlaciona con el grado de desajuste de MHC entre el par respondedor-estimulador (Forrester *et al.*, 2004, Corneal Transplantation: An Immunological Guide to the Clinical Problem, Imperial College Press, 66-67). Una respuesta de MLR da como resultado la proliferación de células donantes respondedoras y la producción de citocinas derivadas de célula T  $T_H1$  (IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) y  $T_H2$  (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13). Se piensa que el perfil exacto de citocinas en una MLR es específico para el emparejamiento respondedor-estimulador (Jordan *et al.*, 2002, J. Immunol. Methods, 260, 1-14). Los ensayos de MLR se han utilizado ampliamente en la investigación para estudiar las vías de activación de las células T y seleccionar fármacos inmunosupresores, y en ajustes clínicos para evaluar la función inmunitaria en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y predecir el posible rechazo de órganos de donantes en receptores de trasplantes (Bromelow *et al.*, 2001, J. Immunol. Methods, 247, 1-8).

El efecto de A26Fab'-PEG en la activación y la proliferación de células T alorreactivas humanas *in vitro* se investigó utilizando un ensayo MLR esencialmente tal como lo describe O'Flaherty *et al.*, 2000. Se cocultivaron PBMC de dos donantes no relacionados en presencia y ausencia de A26Fab'-PEG y la proliferación celular se midió mediante incorporación de  $^3H$ -timidina. Tal como se muestra en la figura 5, el A26 Fab'-PEG inhibió la proliferación de células T de una forma dependiente de la dosis con un valor de  $CI_{50}$  de 2,149 nM (0,1877  $\mu g/ml$ ) y una inhibición máxima del 57 %. Los sobrenadantes de la MLR humana se analizaron en un ensayo de citocinas humanas de Meso Scale Discovery (MSD) para investigar el efecto de A26 Fab'-PEG en la producción de citocinas. El A26Fab'-PEGilado inhibió parcialmente la producción de IFN- $\gamma$  (55 % de inhibición), IL-13 (50 % de inhibición) e IL-5 (80 % de inhibición) en la MLR (datos no mostrados).

**Procedimiento: Inhibición de la respuesta proliferativa por MLR de PBCM completas de una vía alogénicas humanas por A26Fab'-PEG.** Se aislaron PBMC humanas de dos donantes no relacionados a partir de sangre completa. Las células de un donante se inactivaron por irradiación y para generar la población estimuladora. Las células donantes restantes formaron la población respondedora. Las poblaciones estimuladoras y respondedoras se mezclaron a una relación de 1:1 ( $1 \times 10^5$  células/donante) y se cultivaron en presencia de A26Fab'-PEG (1 ng-100  $\mu g/ml$ ) durante 6 días. Se utilizó A33 Fab'-PEG (reactivo interno) como reactivo de control. La proliferación celular se midió el día 6 mediante incorporación de  $^3H$ -timidina (0,5  $\mu Ci/pocillo$ ). Los datos se muestran como porcentaje de inhibición con respecto a la respuesta del respondedor más la respuesta del estimulador en ausencia de reactivo biológico, y son los datos combinados de 10 pares de donantes diferentes (media  $\pm$  SEM). Los valores de  $CI_{50}$  se calcularon utilizando el programa informático Graphpad Prism®. Los resultados se muestran en la figura 5.

#### Ejemplo 4b: Respuesta al toxoide tetánico

El toxoide tetánico (TT) induce respuestas inmunitarias específicas de células T fuertes en individuos vacunados. *In vitro*, las respuestas de recuerdo específicas del antígeno a la provocación con TT se pueden detectar realizando un seguimiento de la proliferación y la producción de citocinas ( $T_H1$  y  $T_H2$ ) a partir de PBMC (Bishop *et al.*, 2005). El A26Fab'-PEG inhibió la proliferación y la producción de IL-5, IL-13, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (datos no mostrados) de una forma dependiente de la dosis, con una inhibición máxima de la proliferación que alcanza el 38 %. Los valores de  $CI_{50}$  para la inhibición de la proliferación, calculados para 2 donantes, fueron de 0,58 nM (0,051  $\mu g/ml$ ) y 1,11 nM (0,097  $\mu g/ml$ ). La figura 6 muestra la curva de inhibición de la proliferación de A26Fab'-PEG para 1 donante.

**Procedimiento: El A26 Fab'-PEG inhibe la proliferación de PBMC expuestas a toxoide tetánico.**

Las PBMC se aislaron mediante separación en un gradiente de Ficoll y se expusieron a 1  $\mu g/ml$  de toxoide tetánico (Calbiochem) en presencia de A26Fab'-PEG (intervalo de concentración de 5  $\mu g/ml$  a 0,001  $\mu g/ml$ ) en un volumen final de 200  $\mu l$  por pocillo en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Después de 5 días de incubación a 37 °C, 5 % de  $CO_2$ , 100 % de humedad, se midió la proliferación celular mediante la incorporación de  $^3H$ -timidina (0,5  $\mu Ci/pocillo$ ) en células en división activa. Se presentan los resultados de un único donante representativo. Los valores de  $CI_{50}$  se calcularon utilizando el programa informático Graphpad Prism®.

#### Ejemplo 4c: respuesta a ácaros del polvo domésticos

El asma aguda grave puede estar provocado por antígenos inhalados, tales como el ácaro del polvo doméstico (Tillie-Leblond *et al.*, 2005, Allergy, 60, (1), 23-29), incluidas las especies del género *Dermatophagoides pteronyssinus*. Dichos alérgenos inducen respuestas proliferativas por las células de sangre periférica y la producción de citocinas polarizadas T<sub>H</sub>2, en pacientes atópicos pero no en pacientes no atópicos (Ling *et al.*, 2004, Lancet, 363, 608-615). Se estableció un ensayo *in vitro* para determinar el efecto del bloqueo OX40 en la producción de la citocina T<sub>H</sub>2 IL-13 en respuesta a la exposición al antígeno. Se tomaron PBMC de personas atópicas con una puntuación de IgE específica de alérgeno (RAST) entre 3 y 5 (escala de 0 a 6) y se estimularon con antígeno *Dermatophagoides pteronyssinus* en presencia de A26Fab'-PEG o anticuerpo de control. El A26Fab'-PEG inhibió la producción de IL-13 hasta un máximo del 60 % con un valor de CI<sub>50</sub> de 1,23 nM (figura 7). Además, el A26 Fab'-PEG también inhibió de forma potente la producción de las citocinas IL-4, IL-5 y TNF- $\alpha$  en este ensayo, a la vez que aumentó los niveles de la citocina reguladora IL-10 (figura 8).

**Procedimiento de la figura 7: El A26Fab'-PEG inhibe la producción de IL-13 a partir de PBMC expuestas a extracto alérgénico de *Dermatophagoides pteronyssinus*.** Se aislaron PBMC de voluntarios alérgicos mediante separación en un gradiente de Ficoll. Las PBMC purificadas se expusieron a 25  $\mu$ g/ml de extracto alérgénico de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Greer) en presencia de anticuerpo de ensayo (intervalo de concentración de 10  $\mu$ g/ml a 0,0005  $\mu$ g/ml) en un volumen final de 200  $\mu$ l por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Después de 6 días de incubación a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, 100 % de humedad, los sobrenadantes se recogieron y se analizaron para determinar el contenido de IL-13 mediante ELISA (Biosource). El gráfico representa datos agrupados de tres donantes (media  $\pm$  SEM). Los valores de CI<sub>50</sub> se calcularon utilizando el programa informático Graphpad Prism®.

**Procedimiento de la figura 8: El A26Fab'-PEG modula la producción de citocinas a partir de PBMC expuestas a extracto alérgénico de *Dermatophagoides pteronyssinus*.** Se aislaron PBMC de voluntarios alérgicos mediante separación en un gradiente de Ficoll. Las PBMC purificadas se expusieron a 25  $\mu$ g/ml de extracto alérgénico de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Greer) en presencia de 10  $\mu$ g/ml de A26Fab'-PEG (114 nM) o control (TN3 Fab'-PEG) en un volumen final de 200  $\mu$ l por pocillo en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Después de 6 días de incubación a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, 100 % de humedad, los sobrenadantes se recogieron y analizaron para determinar el contenido de citocinas utilizando un ensayo de múltiples puntos (MSD). Los gráficos representan datos agrupados de tres donantes (media  $\pm$  SEM).

#### Resumen

Los valores de CI<sub>50</sub> para A26Fab'-PEG en ensayos funcionales humanos se resumen en la **tabla 2**. La potencia de A26Fab'-PEG es similar en los tres ensayos y se correlaciona bien con la medición de afinidad basada en células de 1,106 nM. En estos ensayos, se suprimió significativamente la proliferación celular y/o la producción de múltiples citocinas inflamatorias, lo que demuestra que A26Fab'-PEG inhibe profundamente la activación de las células T. Los ensayos de toxoide tetánico y del ácaro del polvo doméstico miden las respuestas de recuerdo de las células T de memoria, lo que significa que A26Fab'-PEG es capaz de inhibir las respuestas de las células T establecidas a una diversidad de antígenos.

**Tabla 2 Valores medios de CI<sub>50</sub> para A26Fab'-PEG en ensayos *in vitro* funcionales humanos**

| Ensayo funcional                                                                        | CI <sub>50</sub> media (nM) | CI <sub>50</sub> media ( $\mu$ g/ml) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| <b>Reacción de linfocitos mixtos –</b><br>Inhibición de la proliferación ( $n = 10$ )   | 2,149                       | 0,1877                               |
| <b>Toxoide del tétanos –</b><br>Inhibición de la proliferación ( $n = 2$ )              | 0,845                       | 0,0733                               |
| <b>Ácaros del polvo doméstico –</b><br>Inhibición de la producción de IL-13 ( $n = 3$ ) | 1,23                        | 0,1067                               |

La respuesta de T<sub>H</sub>2 de memoria atópica al antígeno de ácaros del polvo domésticos proporciona un ensayo relevante *in vitro* para determinar asma alérgica y los datos sugieren que el A26Fab'-PEG puede ser un tratamiento eficaz en esta indicación. La coestimulación de OX40 se ha relacionado previamente con la inflamación pulmonar, sugiriendo que desempeña un papel fundamental tanto en la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes específicas de alérgeno en células T<sub>H</sub>2 inflamatorias y las respuestas de recuerdo de células T<sub>H</sub>2 de memoria (Wang y Liu, 2007, J. Clin. Invest, 117 (12), 3655-3657). Durante la inflamación alérgica, la citocina innata linfopoyetina estromal tímica (TSLP) producida por células epiteliales estresadas conduce a la maduración de células dendríticas humanas e induce la expresión de OX40L. El OX40L funciona promoviendo la polarización T<sub>H</sub>2 de células T CD4<sup>+</sup> con un fenotipo inflamatorio de producción de TNF- $\alpha$  mejorado pero sin producción de IL-10 (Ito *et al.*, 2005, J. Exp. Med, 202 (9), 1213-1223). En la respuesta de HDM, el A26 Fab'-PEG inhibió de forma potente las citocinas T<sub>H</sub>2 clásicas IL-13, IL-5 e IL-4, así como TNF- $\alpha$ . Además, en dos de cada cuatro donantes alérgicos el A26Fab'-PEG aumentó la producción de IL-10. Por lo tanto, el A26Fab'-PEG puede tener la capacidad no solo de inhibir las respuestas

alérgicas, sino también de modularlas hacia un fenotipo regulador.

#### **Ejemplo 5:**

##### **El A26Fab'-PEG inhibe la proliferación de células T CD4+ y CD8+ en un modelo de Hu-SCID.**

El modelo de Hu-SCID implica la reconstitución de ratones SCID con PBMC humanas que después provocan una fuerte respuesta xenogénica contra el ratón huésped. Esta respuesta se rastrea mediante la proliferación de células T humanas en el ratón. Utilizando datos determinados experimentalmente sobre la PK de A26Fab'-PEG se diseñó un régimen de dosificación que dio como resultado concentraciones plasmáticas en estado estacionario de 8, 23 y 34 µg/ml de A26Fab'-PEG. Los datos en la figura 9 demuestran que las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se inhiben profundamente manteniendo niveles plasmáticos en estado estable de A26Fab'-PEG de 8, 23 y 34 µg/ml.

##### **Procedimiento: El A26Fab'-PEG inhibe la proliferación de células T CD4+ y CD8+ en un modelo de Hu-SCID.**

Los ratones recibieron una dosis de carga s.c. de 0,825, 2,475 o 8,25 mg/kg el día -2 y después diariamente dosis de mantenimiento s.c. de 0,25, 0,75 o 2,5 mg/kg respectivamente. Los ratones se empobrecieron en células NK mediante la dosificación de TMβ1 un día antes de la transferencia de ocho millones de PBMC humanas a la cavidad peritoneal el día 0. El experimento finaliza, entonces, el día 14 y la sangre, el fluido de lavado peritoneal y el homogeneizado de bazo se analizan para determinar células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Los ratones se sacrificaron el día 14 mediante dislocación cervical y se sangraron mediante punción cardíaca. La cantidad de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> humanas se determinó después mediante análisis FACS. Los datos (n = 10) se expresan como medias ± SEM. La disminución de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en la sangre después de la administración de A26Fab'-PEG se muestra en la figura 9.

##### **Ejemplo 6: Reactividad cruzada de A26Fab'-PEG con OX40 de primate no humano**

Para validar el uso de A26Fab'-PEG en modelos de enfermedad de primates no humanos (NHP) y toxicología preclínica, se compararon su afinidad relativa y su potencia funcional en células humanas y NHP.

##### ***Afinidad basada en células en células NHP***

Se aislaron células T CD4<sup>+</sup> de macaco cangrejero o macaco Rhesus a partir de sangre periférica y se activaron para que expresaran altos niveles de OX40. La afinidad de A26Fab'-PEG se midió mediante un análisis de regresión no lineal de curvas de unión de equilibrio, tal como se muestra en la figura 3. El A26Fab'-PEG mostró una disminución de la afinidad por células T CD4<sup>+</sup> de macaco cangrejero o macaco Rhesus inferior a 2 veces en comparación con las humanas, lo que indica que tiene una reactividad cruzada elevada (Tabla 3).

**Tabla 3 Comparación de la afinidad basada en células de A26Fab'-PEG en células humanas y NHP.**

| <b>A26 Fab'-PEG</b>       | <b>K<sub>D</sub> (nM)</b> |
|---------------------------|---------------------------|
| <b>Humano (n = 3)</b>     | 1,106                     |
| <b>Cangrejero (n = 3)</b> | 1,859                     |
| <b>Rhesus (n = 1)</b>     | 1,202                     |

Se separaron PBMC de NHP en un gradiente de linfolito (VH Bio), se activaron con 1 µg/ml de PHA-L durante 3 días a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, 100 % de humedad y se aislaron células T CD4<sup>+</sup> mediante selección negativa utilizando perlas magnéticas (Kit II de aislamiento de células T CD4<sup>+</sup> para primates no humanos; MiltenyiBiotec). Las afinidades se midieron tal como se describe en el ejemplo 3a (figura 3).

##### **Ejemplo 7: Estudio de eficacia en el modelo de CIA de macaco cangrejero**

##### **Fundamento del estudio y diseño del estudio.**

La artritis inducida por colágeno en macaco cangrejero es un modelo estándar que se utiliza para perfilar fármacos antiartríticos potenciales antes de la experimentación con seres humanos. En nuestras manos, este modelo responde a tratamientos dirigidos contra TNFα e IL-6. Estos datos son coherentes con los hallazgos clínicos de AR con productos terapéuticos antihumanos equivalentes.

La inducción de artritis en macacos cangrejeros requiere dos etapas de inmunización con colágeno II separadas por un período de 3 semanas. Los síntomas de artritis (hinchazón y sensibilidad de una o más articulaciones) se pueden manifestar en cualquier momento después de la segunda inmunización y se evaluaron semanalmente utilizando una puntuación de artritis. El experimento se realizó durante 11 semanas en total. El OX40 es una molécula de coestimulación y, por lo tanto, se espera que la interferencia con la función tenga efectos en las fases de inmunización del modelo. Se evaluaron tres regímenes de dosificación con A26 Fab'-PEG. Un grupo recibió

A26Fab'-PEG (100 mg/kg) solo una vez el día antes de la primera inmunización. Un segundo grupo recibió A26 Fab'-PEG (100 mg/kg) solo una vez el día anterior a la segunda inmunización y el tercer grupo recibió A26 Fab'-PEG (100 mg/kg) un día antes de la primera y la segunda inmunización. Un grupo de control de animales recibió un vehículo de tampón de acetato. La aparición de la enfermedad en el grupo tratado con vehículo se caracterizó por elevaciones en suero en la fase aguda de proteína reactiva C (PCR) y haptoglobina (biomarcadores que se miden clínicamente en ensayos de AR). La integridad de la articulación se evaluó mediante rayos X y examen histológico.

#### Resultados y conclusión

En los animales tratados con A26Fab'-PEG el día antes de la primera inmunización, la gravedad de la artritis fue generalmente inferior a la del grupo tratado con vehículo. Estas diferencias en la puntuación de la artritis fueron estadísticamente significativas en los días 49, 63 y 76. La figura 10 muestra un resumen general de los datos para animales individuales expresados como área bajo la curva para las puntuaciones clínicas. La evaluación de rayos X de la erosión ósea en las articulaciones también se redujo (tabla 4), al igual que los cambios histopatológicos (figura 11). Las concentraciones de PCR y haptoglobina tendieron a ser más bajas que en el grupo de control. Se obtuvieron resultados similares para el grupo de animales a los que se les dosificó A26Fab'-PEG un día antes de la primera inmunización y un día antes de la segunda inmunización. Sin embargo, no se observó ningún efecto antiartrítico convincente en animales que recibieron A26Fab'-PEG una sola vez el día antes de la segunda inmunización. Estos datos muestran un efecto antiartrítico del tratamiento anti-OX40 en CIA de macaco cangrejero y demuestran la importancia de OX40 para la iniciación de la respuesta inmunitaria patógena.

**Figura 10: Inhibición de la puntuación de artritis por A26 Fab'-PEG en CIA de macaco cangrejero.** Los datos muestran un área bajo la curva (AUC) de animales individuales para datos de puntuación clínica para animales de control que recibieron tampón de acetato antes de la primera y la segunda inmunizaciones (Ac Ac), animales que recibieron antes de la primera inmunización (A26 Ac), animales que recibieron A26 Fab'-PEG antes de la segunda inmunización (Ac A26) y animales que recibieron A26 Fab'-PEG antes de la primera y la segunda inmunizaciones (A26 A26). Las barras son medianas

**Tabla 4 Efectos del tratamiento con A26 Fab'-PEG en las puntuaciones de rayos X de la erosión ósea**

| Grupo   | Día |           |             |
|---------|-----|-----------|-------------|
|         | 0   | 35        | 76          |
| Ac Ac   | 0   | 3,9 ± 1,7 | 24,8 ± 5,9  |
| A26 Ac  | 0   | 0,3 ± 0,3 | 7,6 ± 3,9*  |
| Ac A26  | 0   | 9,4 ± 4,5 | 17,9 ± 5,9  |
| A26 A26 | 0   | 0,9 ± 0,7 | 5,3 ± 4,8** |

Los animales Ac Ac recibieron tampón de acetato, los animales A26 Ac recibieron A26Fab'-PEG antes de la primera inmunización, los animales Ac A26 recibieron A26 Fab'-PEG antes de la segunda inmunización y los animales A26 A26 recibieron A26 Fab'-PEG antes de la primera y la segunda inmunizaciones. Medias ± s.e.m., \* p <0,05, \*\* p <0,01 ensayo de Wilcoxon.

**Procedimiento de la figura 11: Reducción en la puntuación histológica total en la CIA de macaco cangrejero por A26Fab'-PEG.** Los datos muestran las puntuaciones histológicas totales (que incorporan la degeneración del cartílago y el hueso, la fibrosis, el tejido de granulación y la hiperplasia) para animales individuales al final del estudio. Los animales Ac Ac recibieron tampón de acetato, los animales A26 Ac recibieron A26 Fab'-PEG antes de la primera inmunización, los animales Ac A26 recibieron A26Fab'-PEG antes de la 2ª inmunización y los animales A26A26 recibieron A26 Fab'-PEG antes de la 1ª y la 2ª inmunizaciones. Las barras son medianas. Por supuesto, se entenderá que la presente invención se ha descrito únicamente a modo de ejemplo, de ninguna manera pretende ser limitante, y que pueden realizarse modificaciones de detalles dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes. Las características preferidas de cada forma de realización de la invención son como para cada una de las otras formas de realización *mutatis mutandis*

**LISTADO DE SECUENCIAS**

5 <110> UCB Pharma S.A.  
 LAWSON, Alastair  
 NESBITT, Andrew  
 POPPLEWELL, Andrew  
 SHAW, Stevan  
 SHPEKTOR, Diana  
 ZHANG, Yi  
 10  
 <120> Moléculas de anticuerpo que tienen especificidad por OX40 humano  
 <130> G0088-WO01  
 15 <150> US61/153038  
 <151> 17/02/2009  
 <160> 23  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 20  
 <210> 1  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> CDRH1  
 <400> 1  
 30  
 Asn Tyr Gly Ile His  
 1 5  
 <210> 2  
 <211> 17  
 35 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> CDRH2  
 40  
 <400> 2  
 Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 45 <210> 3  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 50 <220>  
 <223> CDRH3  
 <400> 3  
 55 Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr  
 1 5  
 <210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 60 <213> Artificial

# ES 2 699 716 T3

<220>  
 <223> CDRL1  
 <400> 4

5 Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala Leu Ala  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 10 <213> Artificial

<220>  
 <223> CDRL2

15 <400> 5

Asn Ala Asn Thr Leu His Thr  
 1 5

20 <210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> CDRL3

<400> 6

Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu Thr  
 1 5

30 <210> 7  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Región variable de la cadena ligera del anticuerpo A26

<400> 7

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

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

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

# ES 2 699 716 T3

<210> 8  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> ADN que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo A26  
 <400> 8  
 10 gatatccaga tgacccagag tccaagcagt ctctccgccg gcgtaggcga tcgtgtgact 60  
 attacctgtc gtgcaaccca gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg 120  
 ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataccgg tgttccgtct 180  
 cgtttctctg cgtctgggtc tggtagcgac tctactctga ccatctcctc tctgcagccg 240  
 gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttggtggt 300  
 ggtaccaaag ttgagatcaa acgt 324  
 <210> 9  
 <211> 117  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Región variable de la cadena pesada del anticuerpo A26  
 20 <400> 9  
 Glu 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 Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro 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 Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 25 <210> 10  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> ADN que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo A26  
 <400> 10

# ES 2 699 716 T3

gaggttcagc tggctgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc 60  
tcttgtgcag caagcggttt cacgttcacc aactacggtg tccactggat tcgtcaggca 120  
ccaggtaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctggtggtct gacgtactac 180  
cgtgactctg tcaaaggctg tttcaccatc tctcgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac 240  
ctgcagatga actctctgcg tgcagaagat accgcagtgt actactgcgc tactggtggt 300  
gaaggtatct tcgactactg gggtcagggt accctggtaa ctgtctcgag c 351

<210> 11

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera del anticuerpo A26

<400> 11

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 12  
 <211> 235  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Cadena ligera del anticuerpo A26, incluida la secuencia señal

<400> 12

10

```

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1      5      10      15

Thr Val Ala Gln Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
20      25      30

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln
35      40      45

Ser Ile Tyr Asn Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
50      55      60

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro
65      70      75      80

Ser Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile
85      90      95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100     105     110

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130     135     140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145     150     155     160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165     170     175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180     185     190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195     200     205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210     215     220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225     230     235
    
```

15

<210> 13  
 <211> 645  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20

<220>  
 <223> ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo A26

# ES 2 699 716 T3

<400> 13

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gatatccaga tgacccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact | 60  |
| attacctgtc gtgcaaccca gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg | 120 |
| ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataccgg tgttccgtct | 180 |
| cgtttctctg cgtctggttc tggtagggac tctactctga ccatctcttc tctgcagccg | 240 |
| gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttggtggt | 300 |
| ggtaccaaag ttgagatcaa acgtacgggt gcagctccat ccgtcttcat ctttccaccg | 360 |
| tctgacgaac agtcaaactc tggtagtgct tctgtcgttt gcctcctgaa caacttctat | 420 |
| ccgcgtgaag cgaaagtcca gtggaaagtc gacaacgcac tccagtctgg taactctcag | 480 |
| gaatctgtga ccgaacagga ctccaaagac tccacctact ctctgtctag caccctgact | 540 |
| ctgtccaaag cagactacga gaaacacaaa gtgtacgctt gcgaagttac ccatcagggg | 600 |
| ctgtcttctc cggttaccaa aagctttaat agaggggagt gttaa                 | 645 |

5 <210> 14  
<211> 708  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo A26, incluida la secuencia señal

<400> 14

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggtg gtttcgctac cgtagcgcaa   | 60  |
| gctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg  | 120 |
| actattacct gtcgtgcaac ccagagcatc tacaacgctc tggcttggtg tcagcagaaa  | 180 |
| ccgggtaaag cgccaaaact cctgatctac aacgcgaaca ctctgcatac cgggtgttccg | 240 |
| tctcgtttct ctgcgtctgg ttcttggtacg gactctactc tgaccatctc ctctctgcag | 300 |
| ccggaagatt tcgcgacctc ctactgccag cagtactacg attaccact gacgtttggt   | 360 |
| ggtggtacca aagttgagat caaacgtacg gttgcagctc catccgtctt catctttcca  | 420 |
| ccgtctgacg aacagctcaa atctgggtact gcttctgtcg tttgcctcct gaacaacttc | 480 |
| tatccgcgtg aagcgaaagt ccagtggaaa gtcgacaacg cactccagtc tggttaactct | 540 |
| caggaatctg tgaccgaaca ggactccaaa gactccacct actctctgtc tagcaccctg  | 600 |
| actctgtcca aagcagacta cgagaaacac aaagtgtacg cttgcgaagt taccatcag   | 660 |
| ggtctgtctt ctccggttac caaaagcttt aatagagggg agtggttaa              | 708 |

15 <210> 15  
<211> 228  
<212> PRT  
20 <213> Artificial

<220>  
<223> Cadena pesada del anticuerpo A26

25 <400> 15

# ES 2 699 716 T3

Glu 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 Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro 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 Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
 115 120 125  
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
 130 135 140  
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
 145 150 155 160  
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
 165 170 175  
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
 180 185 190  
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
 195 200 205  
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
 210 215 220  
 Thr Cys Ala Ala  
 225

5 <210> 16  
 <211> 248  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Cadena pesada del anticuerpo A26, incluida la secuencia señal  
 <400> 16

# ES 2 699 716 T3

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

<210> 17

5 <211> 687

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo A26

<400> 17

# ES 2 699 716 T3

gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg ctgtgccagc ctggagggag cctgcgtctc 60  
tcttgtgcag caagcgggtt cacgttcacc aactacggta tccactggat tcgtcaggca 120  
ccaggtaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctggtggtct gacgtactac 180  
cgtgactctg tcaaaggctg tttcaccatc tctcgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac 240  
ctgcagatga actctctgcg tgcagaagat accgcagtgt actactgcgc tactggtggt 300  
gaaggatatct tcgactactg gggtcagggt accctggtaa ctgtctcgag cgcttctacc 360  
aaaggctccga gcgttttccc actggctccg agctctaaat ccacctctgg tggtagggct 420  
gcactggggt gcctgggtgaa agactacttc ccagaaccag ttaccgtgtc ttggaactct 480  
ggtgcactga cctctggtgt tcacacctt ccagcagttc tgcagtcttc tggctctgtac 540  
tccctgtcta gcgtgggttac cgttccgtct tcttctctgg gtactcagac ctacatctgc 600  
aacgtcaacc acaaacctgc caacacgaaa gtggacaaaa aagtcgagcc gaaatcctgt 660  
gacaaaaccc atacctgcgc tgcgtaa 687

<210> 18  
<211> 750  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo A26, incluida la secuencia señal

<400> 18

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60  
gctgagggtc agctgggtcga gtctggaggc gggctgtgcc agcctggagg gagcctgcgt 120  
ctctcttggtg cagcaagcgg tttcacgttc accaactacg gtatccactg gattcgtcag 180  
gcaccaggta aagggtctgga atgggtagcc tctatctctc cgtctggtgg tctgacgtac 240  
taccgtgact ctgtcaaagg tcgtttcacc atctctcgtg atgacgcgaa aaactctccg 300  
tacctgcaga tgaactctct gcgtgcagaa gataccgcag tgtactactg cgctactggt 360  
ggtgaaggta tcttcgacta ctgggggtcag ggtaccctgg taactgtctc gagcgcttct 420  
accaaaggct cgagcggtttt cccactggct ccgagctcta aatccacctc tgggtggtacg 480  
gctgcactgg gttgcctggt gaaagactac ttcccagaac cagttaccgt gtcttggaac 540  
tctggtgcac tgacctctgg tgttcacacc tttccagcag ttctgcagtc ttctggtctg 600  
tactccctgt ctagcgtggt taccgttccg tcttcttctc tgggtactca gacctacatc 660  
tgcaacgtca accacaaacc gtccaacacg aaagtggaca aaaaagtcga gccgaaatcc 720  
tgtgacaaaa ccctacactg cgctgcgtaa 750

<210> 19  
<211> 1459  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> ADN que codifica la cadena pesada y ligera del anticuerpo A26, incluida la secuencia intergénica IGS2

<400> 19

# ES 2 699 716 T3

```

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggtcg gtttcgctac cgtagcgcaa      60
gctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg      120
actattacct gtcgtgcaac ccagagcatc tacaacgctc tggcttggtg tcagcagaaa      180
ccgggtaaag cgccaaaact cctgatctac aacgcgaaca ctctgcatac cgggtgttccg      240
tctcgtttct ctgcgtctgg ttctggtagc gactctactc tgaccatctc ctctctgcag      300
ccggaagatt tcgcgaccta ctactgccag cagtactacg attaccactt gacgtttggt      360
ggtggtacca aagttagatg caaacgtacg gttgcagctc catccgtctt catctttcca      420
ccgtctgacg aacagctcaa atctggtagt gcttctgtcg tttgcctcct gaacaacttc      480
tatccgcgtg aagcgaaagt ccagtggaaa gtcgacaacg cactccagtc tggtaactct      540
caggaatctg tgaccgaaca ggactccaaa gactccacct actctctgtc tagcacctcg      600
actctgtcca aagcagacta cgagaaacac aaagtgtacg cttgcgaagt taccatcag      660
ggtctgtctt ctccggttac caaaagcttt aatagagggg agtggttaaaa tgaagaagac      720
tgctatagca attgcagtgg cgctagctgg tttcgccacc gtggcgcaag ctgaggttca      780
gctggtcgag tctggaggcg ggcttggtcca gcctggaggg agcctgcgtc tctctgtgc      840
agcaagcggg ttcacgttca ccaactacgg tatccactgg attcgtcagg caccaggtaa      900
aggcttgtaa tgggtagcct ctatctctcc gtctggtggt ctgacgtact accgtgactc      960
tgtcaaaggt cgtttcacca tctctcgtga tgacgcgaaa aactctccgt acctgcagat     1020
gaactctctg cgtgcagaag ataccgcagt gtactactgc gctactggtg gtgaaggtat     1080
cttcgactac tggggtcagg gtaccctggg aactgtctcg agcgcttcta ccaaagggtcc     1140
gagcgttttc ccactggctc cgagctctaa atccacctct ggtggtacgg ctgcactggg     1200
ttgcctgggt aaagactact tcccagaacc agttaccgtg tcttggaact ctggtgcact     1260
gacctctggt gttcacacct ttccagcagt tctgcagtct tctggtctgt actccctgtc     1320
tagcgtgggt accgttccgt cttcttctct ggttactcag acctacatct gcaacgtcaa     1380
ccacaaaccg tccaacacga aagtggacaa aaaagtcgag ccgaaatcct gtgacaaaac     1440
ccatacctgc gctgcgtaa                                     1459

```

5 <210> 20  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> CDRH2  
 <400> 20

Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Glu  
 1 5 10 15

15 Gly  
 <210> 21  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 20 <213> Artificial

<220>  
 <223> CDRL1

25 <400> 21

|    |                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | Arg                    | Ala | Thr | Glu | Asp | Ile | Tyr | Asn | Ala | Leu | Ala |
|    | 1                      |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |
|    | <210> 22               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 5  | <211> 11               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <212> PRT              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <213> Artificial       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <220>                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 10 | <223> JH4 humano       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <400> 22               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | Trp                    | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser |
|    | 1                      |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |
| 15 | <210> 23               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <211> 10               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <212> PRT              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <213> Artificial       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 20 | <220>                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <223> secuencia de JK1 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <400> 23               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 25 | Phe                    | Gly | Gln | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys |     |
|    | 1                      |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo antagonista que se une a OX40 humano y reduce la unión de OX40 al ligando de OX40, que comprende:
  - una cadena pesada que comprende un dominio variable que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9 y
  - una cadena ligera que comprende un dominio variable que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7.
2. Un anticuerpo según la reivindicación 1, en el que la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15.
3. Un anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, en el que la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 11.
4. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, siendo el anticuerpo un anticuerpo completo que tiene cadenas pesadas y ligeras de longitud completa.
5. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, siendo el anticuerpo un fragmento de un anticuerpo completo, tal como Fab, Fab' modificado, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, un par VH/VL o un fragmento scFv.
6. Un anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende:
  - una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15 y
  - una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 11.
7. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que se ha modificado para permitir la unión de una molécula efectora o informadora al anticuerpo.
8. Un anticuerpo según la reivindicación 7, en el que la modificación es la adición al extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora o informadora.
9. El anticuerpo de la reivindicación 8, en el que los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o dos residuos de cisteína a los que se puede unir la molécula efectora o informadora.
10. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que tiene una molécula efectora o informadora unida al anticuerpo.
11. Un anticuerpo según la reivindicación 10, que tiene una molécula efectora unida al anticuerpo, en el que la molécula efectora comprende uno o más polímeros.
12. Un anticuerpo según la reivindicación 11, en el que cada uno de los, uno o más, polímeros es un polialquileo, polialquilenilo o polioxialquileo de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado.
13. Un anticuerpo según la reivindicación 11 o 12, en el que cada uno de los, uno o más, polímeros es un metoxipoli(etilenglicol) o poli(etilenglicol).
14. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, que tiene unido a uno de los residuos de cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo un grupo lisil-maleimida o lisil-bis-maleimida; en el que cada uno de los grupos amino del residuo lisilo se ha unido covalentemente a un residuo de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da.
15. Un anticuerpo que tiene especificidad por OX40 humano según la reivindicación 1, que es un fragmento Fab modificado que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 11 y que tiene unido a la cisteína de la posición 226 de la cadena pesada del anticuerpo un grupo lisil-maleimida; en el que cada uno de los grupos amino del residuo lisilo se ha unido covalentemente a un residuo de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da.
16. ADN aislado que codifica las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
17. Un vector de clonación o expresión que comprende ADN según la reivindicación 16.

18. Un vector según la reivindicación 17, comprendiendo el vector las secuencias dadas en la SEQ ID NO: 14 y la SEQ ID NO: 18.
- 5 19. Un vector según la reivindicación 18, comprendiendo el vector la secuencia dada en la SEQ ID NO: 19.
20. Una célula huésped que comprende uno o más vectores de clonación o expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19.
- 10 21. Un proceso para la producción de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 20 y aislar el anticuerpo.
22. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 23. Una composición farmacéutica según la reivindicación 22, que comprende adicionalmente otros ingredientes activos.
24. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una composición farmacéutica según la reivindicación 22 o la reivindicación 23, para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno patológico, en el que el trastorno patológico se selecciona del grupo que consiste en alergia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad autoinmunitaria, artritis reumatoide, asma, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Graves, rechazo de trasplantes, granulomatosis de Wegener, enfermedad inflamatoria de la pelvis, enfermedad de Peyronie, enfermedad celiaca, peritonitis, psoriasis, vasculitis, meningoencefalitis, uveítis autoinmunitaria, trastornos inflamatorios del sistema nervioso central y periférico mediados por el sistema inmunitario, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barré, dermatitis atópica, hepatitis autoinmunitaria, alveolitis fibrosante, nefropatía por IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, pénfigo, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, esclerodermia y pancreatitis.
- 20 25. El uso de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno patológico, en el que el trastorno patológico se selecciona del grupo que consiste en alergia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad autoinmunitaria, artritis reumatoide, asma, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Graves, rechazo de trasplantes, granulomatosis de Wegener, enfermedad inflamatoria de la pelvis, enfermedad de Peyronie, enfermedad celiaca, peritonitis, psoriasis, vasculitis, meningoencefalitis, uveítis autoinmunitaria, trastornos inflamatorios del sistema nervioso central y periférico mediados por el sistema inmunitario, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barré, dermatitis atópica, hepatitis autoinmunitaria, alveolitis fibrosante, nefropatía por IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, pénfigo, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, esclerodermia y pancreatitis.
- 30 26. El anticuerpo o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 24, o su uso según la reivindicación 25, en el que el trastorno patológico es psoriasis.
- 35 27. El anticuerpo o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 24, o su uso según la reivindicación 25, en el que el trastorno patológico es lupus eritematoso sistémico.
- 40 28. Una proteína de fusión que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 6 que se une a OX40 y dos anticuerpos de dominio único unidos al anticuerpo que se une a OX40.
- 45 29. La proteína de fusión de la reivindicación 28, en la que los dos anticuerpos de dominio único son un emparejamiento de pesada variable (VH) y ligera variable (VL), y en la que el emparejamiento VH y VL se une a albúmina.
- 50

Figura 1

(a) Región variable de la cadena ligera del anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 7)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRF  
SASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKR

(b) Región variable de la cadena pesada del anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 9)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYRD  
SVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEIGFDYWGQGTLLTVSS

(c)

CDRH1: NYGIH (SEQ ID NO:1)  
CDRH2: SISPSGGLTYRDSVKG (SEQ ID NO:2)  
SISPSGGLTYRDSVEG (SEQ ID NO:20)  
CDRH3: GGEIGFDY (SEQ ID NO:3)  
CDRL1: RATQSIYNALA (SEQ ID NO:4)  
RATEDIYNALA (SEQ ID NO:21)  
CDRL2: NANTLHT (SEQ ID NO:5)  
CDRL3: QQYYDYPLT (SEQ ID NO:6)

(d) Cadena ligera del anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 11)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRF  
SASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ  
LKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADY  
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(e) Cadena ligera del anticuerpo A26 incluida la secuencia señal (SEQ ID NO: 12)

MKKTALAIAVAGFATVAQADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPG  
KAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTK  
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 1 (continuación)

(f) Cadena pesada del anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 15)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYIRD  
SVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLVTVSSASTKGPS  
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV  
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCAA

(g) Cadena pesada del anticuerpo A26 incluida la secuencia señal (SEQ ID NO: 16)

MKKTALAIAVAGFATVAQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAP  
GKGLEWVASISPSGGLTYIRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGI  
FDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCA  
A

(h) ADN que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 8)

GATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTG  
TCGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAC  
TCCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGT  
ACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTA  
CTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAGATCAAACGT

Figura 1 (continuación)

(i) ADN que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 10)

GAGGTTTCAGCTGGTTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTC  
TTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTACAGGCACCG  
GTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTACTACCGTGAC  
TCTGTCAAAGGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCGTACCTGCAGAT  
GAACTCTCTGCGTGCAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCT  
TCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCGAGC

(j) ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 13)

GATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTAT  
TACCTGTCTGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAAACCGGGTA  
AAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTTT  
TCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATT  
CGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAG  
TTGAGATCAAACGTACGGTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACAG  
CTCAAATCTGGTACTGCTTCTGTCTGCTTTCCTCCTGAACAACTTCTATCCGCGTGAAGCGAA  
AGTCCAGTGGAAAGTCGACAACGCACTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAAC  
AGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCTCTGTCTAGCACCCCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTAC  
GAGAAACACAAAGTGTACGCTTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGTCTTCTCCGGTTACCAA  
AAGCTTTAATAGAGGGGAGTGTTAA

(k) ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo A26 incluida la secuencia señal (SEQ ID NO: 14)

ATGAAAAAGACAGCTATCGCAATTGCAGTGGCCTTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAAGC  
TGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTA  
TTACCTGTCTGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAAACCGGGT  
AAAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTTT  
CTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATT  
TCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAG  
GTTGAGATCAAACGTACGGTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACA  
GCTCAAATCTGGTACTGCTTCTGTCTGCTTTCCTCCTGAACAACTTCTATCCGCGTGAAGCGA  
AAGTCCAGTGGAAAGTCGACAACGCACTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAAC  
CAGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCTCTGTCTAGCACCCCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTAC  
CGAGAAACACAAAGTGTACGCTTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGTCTTCTCCGGTTACCA  
AAAGCTTTAATAGAGGGGAGTGTTAA

Figura 1 (continuación)

(l) ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 17)

GAGGTTTCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTC  
TTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTCAGGCACCAG  
GTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTAATAACCGTGAC  
TCTGTCAAAGGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCGTACCTGCAGAT  
GAACTCTCTGCGTGCAGAAGATAACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCT  
TCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACCAAAGGTCCGAGC  
GTTTTCCCACTGGCTCCGAGCTCTAAATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTTGCCT  
GGTGAAAGACTACTTCCCAGAACCAGTTACCGTGTCTTGGAATCTGGTGCCTGACCTCTG  
GTGTTTACACCTTTCCAGCAGTTCTGCAGTCTTCTGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGTT  
ACCGTTCCGTCTTCTTCTCTGGGTACTCAGACCTACATCTGCAACGTCAACCACAAACCGTC  
CAACACGAAAGTGGACAAAAAAGTCGAGCCGAAATCCTGTGACAAAACCCATACCTGCGCTG  
CGTAA

(m) ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo A26 incluida la secuencia señal (SEQ ID NO: 18)

ATGAAGAAGACTGCTATAGCAATTGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTCGCCACCGTGGCGCAAGC  
TGAGGTTTCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCT  
CTTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTCAGGCACCA  
GGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTAATAACCGTGA  
CTCTGTCAAAGGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCGTACCTGCAGA  
TGAATCTCTGCGTGCAGAAGATAACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATC  
TTCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACCAAAGGTCCGAG  
CGTTTTCCCACTGGCTCCGAGCTCTAAATCCACCTCTGGTGGTACCGCTGCACTGGGTTGCC  
TGGTGAAAGACTACTTCCCAGAACCAGTTACCGTGTCTTGGAATCTGGTGCCTGACCTCT  
GGTGTTCACACCTTTCCAGCAGTTCTGCAGTCTTCTGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGT  
TACCGTTCCGTCTTCTTCTCTGGGTACTCAGACCTACATCTGCAACGTCAACCACAAACCGT  
CCAACACGAAAGTGGACAAAAAAGTCGAGCCGAAATCCTGTGACAAAACCCATACCTGCGCT  
GCGTAA

Figura 1 (continuación)

(n) ADN que codifica la cadena pesada y ligera del anticuerpo A26 incluida la secuencia intergénica IGS2 (SEQ ID NO: 19)

ATGAAAAAGACAGCTATCGCAATTGCAGTGGCCTTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAAGC  
TGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTA  
TTACCTGTTCGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGT  
AAAGCGCCAAAAC'TCCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTT  
CTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATT  
TCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAA  
GTTGAGATCAAACGTACGGTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACA  
GCTCAAATCTGGTACTGCTTCTGTGCTTTGCCTCCTGAACAACTTCTATCCGCGTGAAGCGA  
AAGTCCAGTGGAAAGTCGACAACGCACTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAA  
CAGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCTCTGTCTAGCACCCCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTA  
CGAGAAACACAAAGTGTACGCTTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGTCTTCTCCGGTTACCA  
AAAGCTTTAATAGAGGGGAGTGTTAAAATGAAGAAGACTGCTATAGCAATTGCAGTGGCGCT  
AGCTGGTTTCGCCACCGTGGCGCAAGCTGAGGTTTCAGCTGGTTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTG  
TCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAACTAC  
GGTATCCACTGGATTTCGTACGGCACCAGGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCC  
GTCTGGTGGTCTGACGTACTACCGTGACTCTGTCAAAGGTGTTTTACCATCTCTCGTGATG  
ACGCGAAAAACTCTCCGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTAC  
TACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGT  
CTCGAGCGCTTCTACCAAAGGTCCGAGCGTTTTCCCACTGGCTCCGAGCTCTAAATCCACCT  
CTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTTCCTGGTGAAGACTACTTCCCAGAACCAGTTACCGTG  
TCTTGGAACTCTGGTGCCTGACCTCTGGTGTTCACACCTTTCCAGCAGTTCTGCAGTCTTC  
TGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGTTACCGTTCCGTCTTCTTCTCTGGGTACTCAGACCT  
ACATCTGCAACGTCAACCACAAACCGTCCAACACGAAAGTGACAAAAAACTCGACCCGAAA  
TCCTGTGACAAAACCCATACCTGCGCTGCGTAA

Figura 2

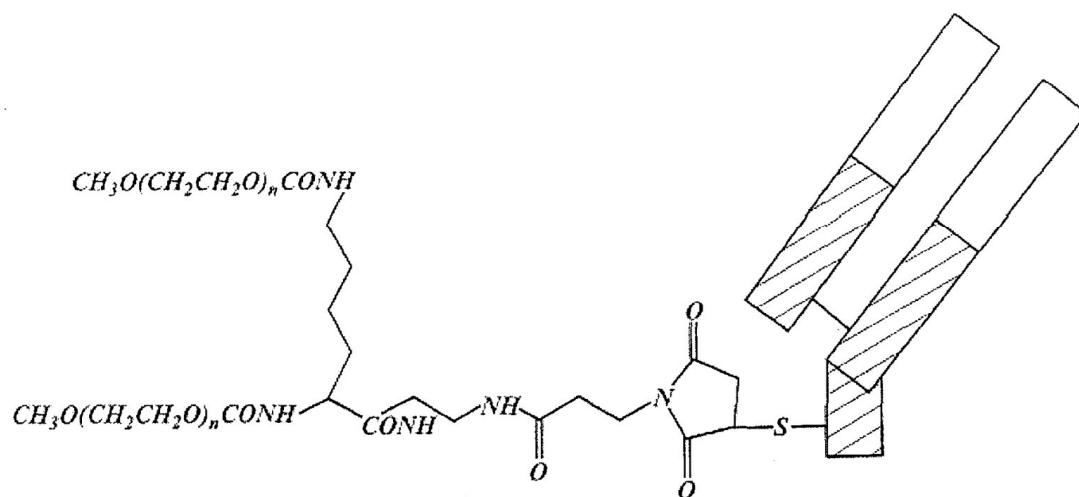


Figura 3

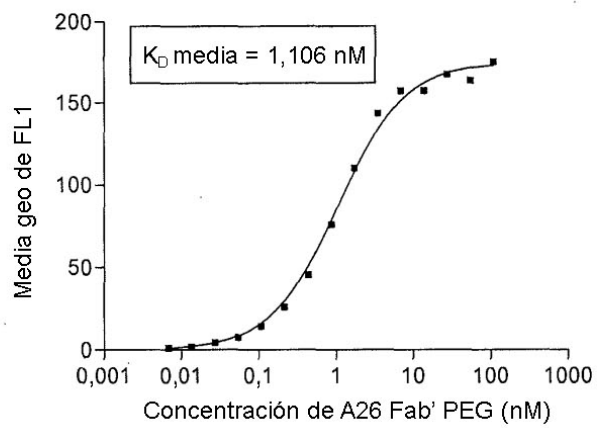


Figura 4

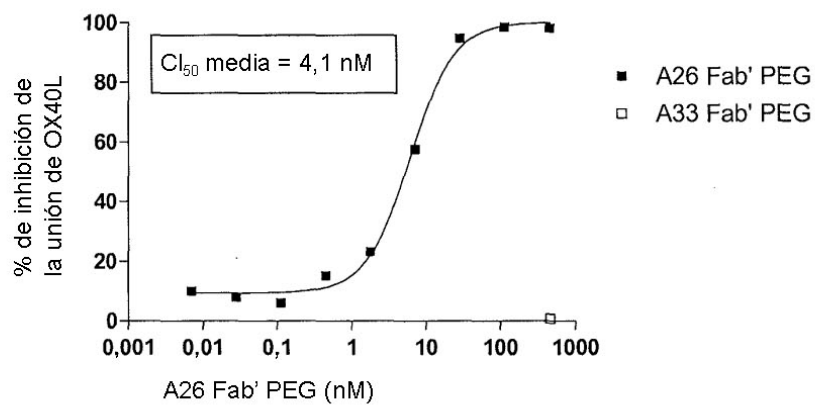


Figura 5

MLR humana - A26 Fab' PEG

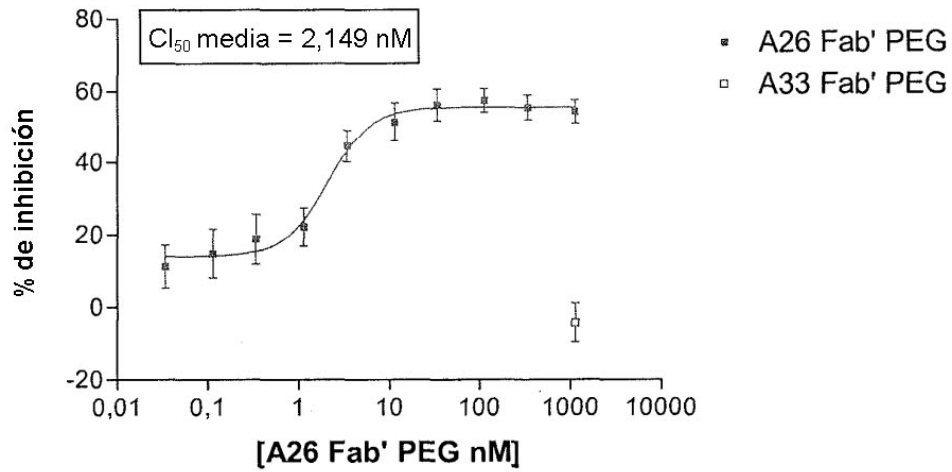


Figura 6

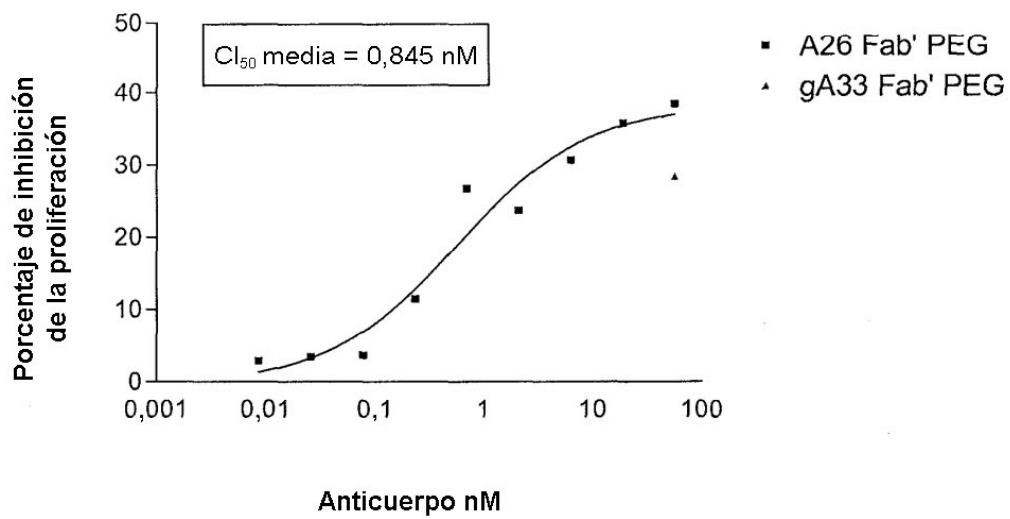


Figura 7

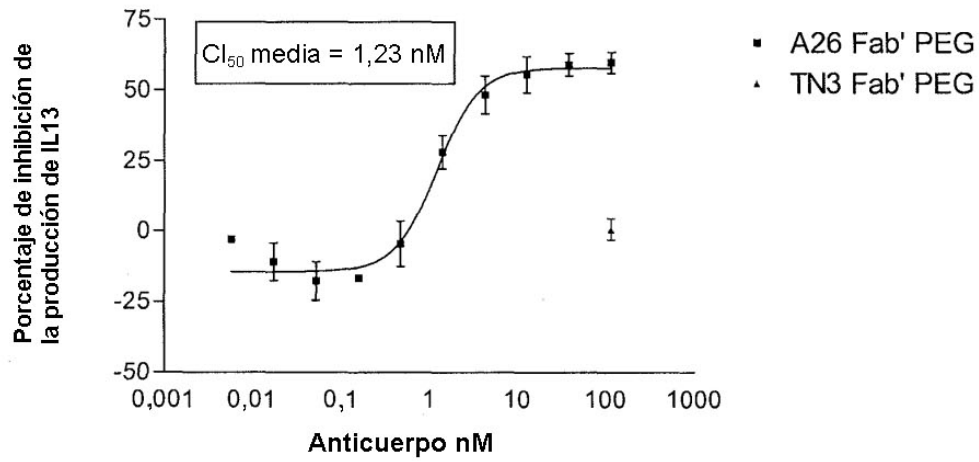


Figura 8

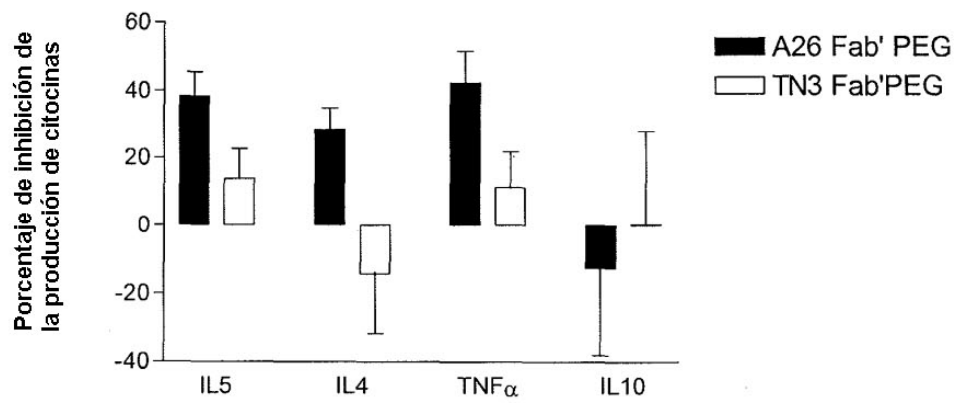
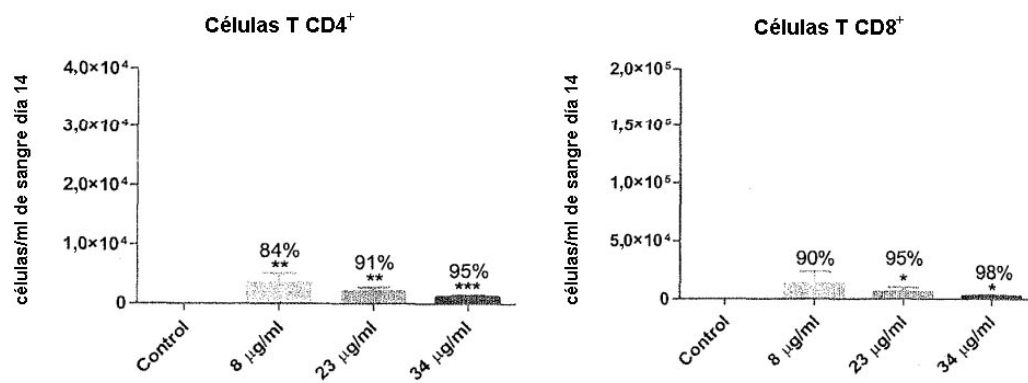
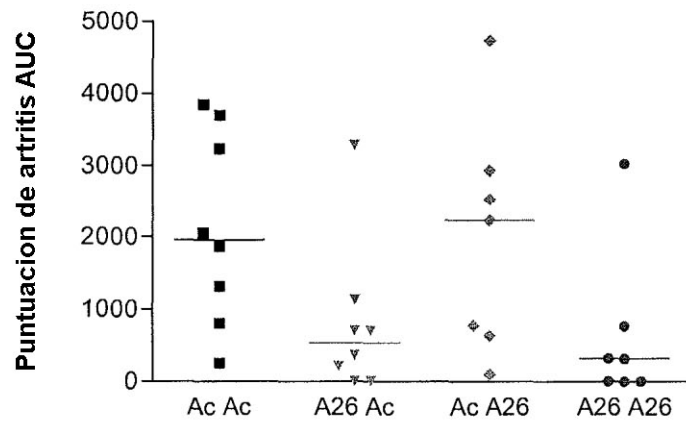


Figura 9



**Figura 10**



**Figura 11**

**Puntuaciones histológicas totales**

