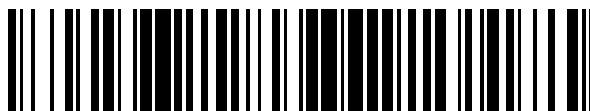


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 998**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/44** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2012 PCT/EP2012/072325**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13068563**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2012 E 12803508 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2776469**

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

30 Prioridad:

**11.11.2011 US 201161558545 P**

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

**17.01.2020**

73 Titular/es:

**UCB BIOPHARMA SRL (100.0%)  
Allé de la Recherche 60  
1070 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**ADAMS, RALPH;  
BHATTA, PALLAVI;  
HEYWOOD, SAM PHILIP y  
HUMPHREYS, DAVID PAUL**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 737 998 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 divulgación se refiere a moléculas de anticuerpo que tienen especificidad por determinantes antígenos de OX40 y composiciones que comprenden los mismos. La presente divulgación también se refiere a los usos terapéuticos de las moléculas de anticuerpo, composiciones y métodos para producir dichas moléculas de anticuerpo.

10 OX40 (también conocidos como CD134, TNFRSF4, ACT35 o TXGP1L) es un miembro de la superfamilia del receptor de TNF, que incluye 4-1BB, CD27, CD30 y CD40. El dominio de unión a ligando extracelular de OX40 está compuesto de 3 dominios ricos en cisteína (CRD) completos y un cuarto CRD en el extremo C parcial (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). OX40 es un receptor unido a 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. OX40 no se expresa en linfocitos T en reposo, pero se expresa transitoriamente en linfocitos T activados después de ligamiento del receptor de linfocitos T (TCR). El ligando para OX40, OX40L, es un miembro de la familia de TNF y se expresa en células presentadoras de antígeno (APC) activadas, incluyendo linfocitos B, macrófagos, células endoteliales y células dendríticas (DC).

25 OX40 es un receptor coestimulador principal con acoplamiento secuencial de CD28 y OX40 que se requiere para la proliferación y supervivencia óptima de linfocitos T. El ligamiento de OX40 en linfocitos T activados da lugar a producción potenciada de citocinas y proliferación de linfocitos T tanto CD4+ como CD8+ T (Gramaglia *et al.*, 2000, J. Immunol, 165, 3043-3050, Bansal-Pakala *et al.*, 2004, J. Immunol, 172, 4821-425) y puede contribuir a ambas respuestas Th1 y Th2 en curso (Gramaglia *et al.*, 1998, J. Immunol., 161, 6510-6517, Arestides *et al.*, 2002, Eur. J. Immunol. 32, 2874-2880). La coestimulación de OX40 prolonga la supervivencia de los linfocitos T más allá de la fase efectora inicial de la respuesta inmunitaria y aumenta el número de linfocitos T de memoria a través de la inhibición de la muerte de linfocitos T efectores.

35 Cuando la activación inmunitaria es excesiva o está incontrolada, puede producirse alergia patológica, asma, inflamación, enfermedades autoinmunitarias y otras enfermedades relacionadas. Como OX40 funciona potenciando las respuestas inmunitarias, puede exacerbar enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias.

40 La función de las interacciones de OX40/OX40L en modelos de enfermedad se ha demostrado en ratones de inactivación de OX40. En encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), un modelo de esclerosis múltiple, se apreciaron signos clínicos menos graves de enfermedad e infiltrado inflamatorio reducido dentro del SNC en ratones de inactivación de OX40 (Carboni *et al.*, 2003, J. Neuroimmunology, 145, 1-11). Además, los ratones de inactivación de OX40 sensibilizados y expuestos con ovalbúmina muestran inflamación pulmonar disminuida (80 - 90 % de reducción en eosinofilia), producción reducida de moco e hiperreactividad significativamente atenuada de las vías respiratorias (Jember *et al.*, 2001, J. Exp. Med., 193, 387-392). Los anticuerpos monoclonales contra el ligando de OX40 murino han demostrado 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 restablecidos de linfocitos T (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 *et al.*, 2003, J. Exp. Med., 198, 315-324, Hoshino *et al.*, 2003, Eur. J. Immunol, 33, 861-869). Se ha perfilado un anticuerpo contra OX40L humano en un modelo de inflamación pulmonar en macacos cangrejeros y produjo niveles reducidos de IL-5, IL-13 y linfocitos T de memoria efectores en líquido de lavado bronquiolar después de exposición a alérgeno (Seshasayee *et al.*, 2007, J. Clin. Invest, 117, 3868-3878).

55 Se ha apreciado un aumento en la expresión de OX40 en varias enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias. Esto incluye un aumento en la expresión de OX40 en linfocitos T aislados 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). Asimismo, se ha apreciado un aumento en la expresión de OX40 en 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). OX40L también puede detectarse en músculo liso de las vías respiratorias humanas (ASM) y las células ASM de pacientes asmáticos muestran mayores respuestas inflamatorias al ligamiento de OX40L que los donadores sanos, lo que indica una función de la ruta de 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 de que los linfocitos T CD4+ aislados de sangre periférica de pacientes con lupus eritematoso diseminado (SLE) expresan niveles elevados de OX40 que están asociados con actividad de enfermedad (Patschan *et al.*, 2006, Clin. Exp. Immunol., 145, 235-242).

Dada la función de OX40 en alergia, asma y enfermedades asociadas con autoinmunidad e inflamación, una estrategia para el tratamiento en estas enfermedades es bloquear la señalización de OX40-OX40L mediante el uso de anticuerpos anti-OX40L o anticuerpos anti-OX40 agonistas.

5 Se han descrito anticuerpos anti-OX40L, véase, por ejemplo, el documento WO 2006/029879. Se han descrito numerosos anticuerpos anti-OX40 agonistas, pero se conocen muy pocos anticuerpos anti-OX40 antagonistas. Se produjo 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 generaron anticuerpos monoclonales de ratón, 131 y 315, que se unen a OX40 humano por Imura *et al.*, 1996, J. Exp. Med, 2185-2195.

10 Se han descritos anticuerpos antagonistas completamente humanos en el documento WO 2007/062245, siendo la máxima prioridad de estos anticuerpos una afinidad por OX40 expresado en superficie celular (linfocitos T activados) de 11 nM.

15 Se han descrito anticuerpos antagonistas humanizados en el documento WO 2008/106116 y el anticuerpo con la máxima afinidad por OX40 tenía una afinidad de 0,94 nM.

Se han descrito otros anticuerpos anti-OX40, incluyendo L106 murino (patente de Estados Unidos n.º 6 277 962) y ACT35 murino, disponible en el mercado en eBioscience.

20 Se han descrito previamente anticuerpos anti-OX40 antagonistas de alta afinidad en la solicitud de patente internacional n.º WO 2010/096418.

25 También se ha descrito previamente en la solicitud de patente internacional n.º WO 2010/035012, una molécula de fusión de anticuerpo multiespecífico novedosa, a partir de ahora mencionada en este documento como Fab-dsFv e ilustrada en este documento en la figura 1. La misma solicitud proporciona regiones variables de unión antialbúmina útiles que pueden usarse para prolongar la semivida de la molécula.

30 El documento WO 2011/030107A1 describe anticuerpos multivalentes.

El documento WO 2011/086091A1 describe anticuerpos trivalentes.

El documento WO 2011/036460A1 describe anticuerpos multivalentes estabilizados con disulfuro.

35 En la presente divulgación, estas regiones variables de unión a albúmina se han mejorado y combinado en el formato Fab-dsFv con los anticuerpos anti-OX40 descritos en el documento WO 2010/096418. La nueva molécula biespecífica de la presente divulgación tiene eficacia mejorada en varios ensayos *in vitro* e *in vivo* descritos en este documento en comparación con la molécula Fab'-PEG previamente descrita en el documento WO 2010/096418. Por ejemplo, consiguientemente, la presente divulgación proporciona una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico que se une tanto a OX40 humano como a seroalbúmina humana que es adecuada para su uso en el tratamiento o profilaxis de trastornos patológicos mediados por OX40 o asociados con un nivel aumentado de OX40.

Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1 muestra una fusión de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación (formato Fab-dsFv)

Las figuras 2-8 muestran determinadas secuencias de aminoácidos o ADN que se refieren a un anticuerpo de acuerdo con la divulgación

50 La figura 9a muestra la unión del Fab-dsFv A26 marcado con AlexaFluor 488 a linfocitos T CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> humanos

La figura 9b muestra la unión para Fab' A26, Fab-Fv A26 y Fab'-PEG A26 en presencia de HSA al 5 % en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, OX40<sup>+</sup> humanos

55 La figura 10a muestra el efecto del Fab-dsFv A26 sobre la producción de citocinas a partir de PBMC expuestos a extracto alérgico de *Dermatophagoides pteronyssinus*

La figura 10b muestra la capacidad de Fab-dsFv A26 de inhibir la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en un modelo de ratón de Hu-NSG

60 La figura 11a muestra la inhibición de la unión de OX40L a linfocitos T CD4<sup>+</sup> OX40<sup>+</sup> activados humanos por Fab-dsFv A26

65 La figura 11b muestra la inhibición de la unión de OX40L a linfocitos T CD4<sup>+</sup> OX40<sup>+</sup> activados humanos por Fab' A26, Fab-dsFv A26, Fab'-PEG A26 y dos controles.

La figura 12a muestra que el Fab-Fv A26 inhibe la reacción de linfocitos mixtos (MLR) humana

La figura 12b muestra que el Fab-Fv A26 inhibe la producción de IFN-gamma durante una MLR humana

5 La figura 13 muestra que Fab-Fv A26 reduce el porcentaje de linfocitos T CD4+ activados (CD25+) después de reestimulación secundaria con antígeno con extracto alérgico de *Dermatophagoides pteronyssinus*

La figura 14 muestra que Fab-Fv y Fab-PEG administrados antes de la transferencia celular inhibe dependientemente de la dosis la proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+ en el modelo de Hu-NSG

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

15 El anticuerpo CA044\_00026 humanizado anti-OX40, se menciona en este documento como A26.

La molécula de fusión de anticuerpo de la presente divulgación, mencionada en este documento como Fab-dsFv, se ilustra en la figura 1. En la presente divulgación la parte Fab (que comprende la primera región variable de cadena pesada y ligera y los dominios constantes) se une a OX40 humano y la parte dsFv (que comprende la segunda región variable de cadena pesada y ligera, unida por un enlace disulfuro) se une a seroalbúmina humana. En particular, la parte Fab comprende las CDR derivadas de un anticuerpo anti-OX40 antagonista y la parte Fv comprende la región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humanizado anti-albúmina, y estas regiones variables de unión a albúmina están unidas por un enlace disulfuro.

20 Por ejemplo, consiguiente, la presente divulgación proporciona una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico que se une a OX40 humana y seroalbúmina humana, que comprende:

una cadena pesada que comprende, en secuencia desde el extremo N, un primer dominio variable de cadena pesada ( $V_{H1}$ ), un dominio CH1 y un segundo dominio variable de cadena pesada ( $V_{H2}$ ),

30 una cadena ligera que comprende, en secuencia desde el extremo N, un primer dominio variable de cadena ligera ( $V_{L1}$ ), un dominio CL y un segundo dominio variable de cadena ligera ( $V_{L2}$ ),

en la que dichas cadenas pesada y ligera se alinean de modo que  $V_{H1}$  y  $V_{L1}$  forman un primer sitio de unión a antígeno y  $V_{H2}$  y  $V_{L2}$  forman un segundo sitio de unión a antígeno,

en la que el antígeno unido por el primer sitio de unión a antígeno es OX40 humano y el antígeno unido por el segundo sitio de unión a antígeno es seroalbúmina humana, en particular

35 en la que el primer dominio variable de la cadena pesada ( $V_{H1}$ ) 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 y el primer dominio variable de la cadena ligera ( $V_{L1}$ ) 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,

40 en la que el segundo dominio variable de la cadena pesada ( $V_{H2}$ ) tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 11 y el segundo dominio variable de la cadena ligera ( $V_{L2}$ ) tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 12 y el dominio segundo variable de la cadena pesada ( $V_{H2}$ ) y el segundo variable de la cadena ligera ( $V_{L2}$ ) están unidos por un enlace disulfuro.

45 Los restos en los dominios variables de anticuerpo se numeran convencionalmente de acuerdo con un sistema ideado por Kabat *et al.* Este sistema se expone en Kabat *et al.*, 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, EE. UU. (a partir de ahora en este documento "Kabat *et al.*, (supra)"). Este sistema de numeración se usa en la presente memoria descriptiva excepto cuando se indique lo contrario.

50 Las denominaciones de restos de Kabat no siempre corresponden directamente con la numeración lineal de los restos de aminoácido. La secuencia real de aminoácidos lineal puede contener menos o más aminoácidos que en la numeración de Kabat estricta correspondiente a un acortamiento de, o inserción en, un componente estructural, sea una región estructural o determinante de complementariedad (CDR), de la estructura de dominio variable básica. La numeración de Kabat correcta de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineación de los restos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "convencional".

60 Las CDR del dominio variable de cadena pesada están ubicadas en los restos 31-35 (CDR-H1), restos 50-65 (CDR-H2) y restos 95-102 (CDR-H3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, de acuerdo con Chothia (Chothia, C. y Lesk, A.M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), el bucle equivalente a CDR-H1 se extiende desde el resto 26 hasta el resto 32. Por tanto, salvo que se indique de otro modo "CDR-H1" como se emplea en este documento pretende hacer referencia a los restos 26 a 35, como se describe por una combinación del sistema de numeración de Kabat y la definición de bucles topológicos de Chothia.

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

La proteína de fusión biespecífica de la presente divulgación comprende un fragmento Fab del anticuerpo antagonista anti-OX40 previamente descrito en el documento WO 2010/096418. Como se usa en este documento, el término "antagonista" describe una proteína de fusión de anticuerpo que puede 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 y, por tanto, inhibiendo la activación de OX40.

El cribado de anticuerpos para identificar aquellos que se unen a OX40 puede realizarse usando ensayos para medir la unión a OX40 humano y/o ensayos para medir la capacidad de bloquear la unión de OX40 a su ligando, OX40L. Un ejemplo de un ensayo de unión es un ELISA, en particular, usando una proteína fusión de OX40 humano y Fc humano, que se inmoviliza en placas, y empleando 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 proteína de fusión del ligando de OX40 que se une a OX40 en células CD4 humanas. Se usa un anticuerpo secundario marcado de forma fluorescente para detectar la cantidad de proteína de fusión de ligando de OX40 que se une a la célula. Este ensayo busca una reducción en la señal ya que el anticuerpo en el sobrenadante bloquea la unión de la proteína de fusión de ligando a OX40. Un ejemplo adicional de un ensayo de bloqueo es un ensayo donde el bloqueo de la coestimulación de linfocitos T humanos vírgenes mediada por la proteína de fusión del ligando de OX40 recubierta sobre una placa se mide midiendo la incorporación de timidina tritiada.

En la presente divulgación, las regiones variables están humanizadas. Los anticuerpos humanizados (que incluyen anticuerpos de CDR injertadas) son moléculas de anticuerpo que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una especie no humana y una región estructural de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, el documento US 5 585 089; el documento WO 91/09967). Se apreciará que puede ser necesario únicamente transferir los restos determinantes de 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 además opcionalmente uno o más restos estructurales derivados de la especie no humana de la que se obtienen las CDR.

En la presente divulgación, las CDR de  $V_{H1}$  y  $V_{L1}$  se obtiene del anticuerpo conocido como A26, descrito en el documento WO 2010/096418. Por ejemplo, consiguiente, en la proteína de fusión de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación, el primer dominio variable de la cadena pesada ( $V_{H1}$ ) comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 o en la SEQ ID NO: 23 para CDR-H2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3 para CDR-H3 y el primer dominio variable de la cadena ligera ( $V_{L1}$ ) comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 o en la SEQ ID NO: 24 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 puede hacerse una o más sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácido a las CDR proporcionadas por la presente divulgación sin alterar significativamente la capacidad del anticuerpo de unirse a OX40 y de neutralizar la actividad de OX40. En efecto de cualquier sustitución, adición y/o eliminación de aminoácido puede ensayarse fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, usando los métodos descritos en el documento WO 2010/096418, para determinar la unión de OX40 y la inhibición de la interacción de OX40/OX40L. Por ejemplo, consiguiente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo biespecífico que tiene especificidad por OX40 humano que comprende CDRH-1 (SEQ ID NO: 1), CDRH-2 (SEQ ID NO: 2), CDRH-3 (SEQ ID NO: 3), CDRL-1 (SEQ ID NO: 4), CDRL-2 (SEQ ID NO: 5) y CDRL-3 (SEQ ID NO: 6) como se muestra en la figura 2(c), por ejemplo, en que uno o más aminoácidos, por ejemplo, 1 o 2 aminoácidos en una o más de las CDR, se han sustituido con otro aminoácido, tal como un aminoácido similar como se define en este documento a continuación.

En un ejemplo, una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación comprende una cadena pesada, en la que el primer dominio variable de la cadena pesada comprende tres CDR en las que la secuencia de CDRH-1 tiene al menos un 90 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1, CDRH-2 tiene al menos un 90 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 y/o CDRH-3 tiene al menos un 90 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3. En otro ejemplo, una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende tres CDR en las que la secuencia de CDRH-1 tiene al menos un 95 % o un 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1, CDRH-2 tiene al menos un 95 % o un 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 y/o CDRH-3 tiene al menos un 95 % o un 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 resto de aminoácido es idéntico entre las secuencias. "Similitud", como se usa en este documento, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el resto 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 pueden sustituirse por otro incluyen, aunque 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 tiene cadenas laterales amida); y
- cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre).

Los grados de identidad y similitud pueden calcularse 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 en NCBI (Altschul, S.F. *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. y 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, una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación comprende una cadena ligera, en la que el primer dominio variable de la cadena ligera comprende tres CDR en las que la secuencia de CDRL-1 tiene al menos un 90 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4, CDRL-2 tiene al menos un 90 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 y/o CDRL-3 tiene al menos un 90 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6. En otro ejemplo, una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación comprende una cadena ligera, en la que el primer dominio variable de la cadena ligera comprende tres CDR en las que la secuencia de CDRL-1 tiene al menos un 95 % o un 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4, CDRL-2 tiene al menos un 95 % o un 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 y/o CDRL-3 tiene al menos un 95 % o un 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6.

En un ejemplo, la parte Fab de la proteína de fusión de anticuerpo biespecífico proporcionada por la presente divulgación es una molécula de anticuerpo humanizada o de CDR injertadas que comprende una o más de las CDR proporcionadas en la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y/o 6 (figura 2 (c)) o variantes de las mismas. Como se usa en este documento, la expresión "molécula de anticuerpo de CDR injertadas" se refiere a una molécula de anticuerpo en la que la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDR (incluyendo, si se desea, una o más CDR modificadas) de un anticuerpo donador (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino) injertado en una estructura de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptador (por ejemplo, un anticuerpo humano). Para una revisión, véase Vaughan et al, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. En un ejemplo, en lugar de transferirse la CDR completa, se transfieren únicamente uno o más de los restos determinantes de especificidad de una cualquiera de las CDR descritas en este documento anteriormente a la estructura de anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Kashmiri *et al.*, 2005, Methods, 36, 25-34). En un ejemplo, se transfieren únicamente los restos determinantes de especificidad de una o más de las CDR descritas en este documento anteriormente a la estructura de anticuerpo humano. En otro ejemplo, se transfieren únicamente los restos determinantes de especificidad de cada una de las CDR descritas en este documento anteriormente a la estructura de anticuerpo humano.

Cuando las CDR o restos determinantes de especificidad se injertan, puede usarse cualquier secuencia estructural de región variable aceptadora apropiada que esté relacionada con la clase/tipo del anticuerpo donador del que se obtienen las CDR, incluyendo regiones estructurales de ratón, primate y ser humano. Adecuadamente, el anticuerpo de CDR injertadas de acuerdo con la presente divulgación tiene un dominio variable que comprende regiones estructurales aceptadoras humanas, así como una o más de las CDR o restos determinantes de especificidad descritos anteriormente. Por tanto, en un ejemplo se proporciona un anticuerpo de CDR injertadas neutralizante en el que el dominio variable comprende regiones estructurales aceptadoras humanas y CDR donadoras no humanas.

Ejemplos de estructuras humanas que pueden usarse en la presente divulgación son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat *et al.*, *supra*). Por ejemplo, KOL y NEWM pueden usarse para la cadena pesada, REI puede usarse para la cadena ligera y EU, LAY y POM pueden usarse tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. Como alternativa, pueden usarse secuencias de la línea germinal humana; estas están disponibles en: <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>

En un anticuerpo de CDR injertadas de la presente divulgación, las cadenas pesada y ligera aceptadoras no tienen que obtenerse necesariamente del mismo anticuerpo y, si se desea, pueden comprender cadenas compuestas que tienen regiones estructurales derivadas de diferentes cadenas.

Una región estructural adecuada para el primer dominio variable de cadena pesada (VH1) de la presente divulgación se obtiene de la secuencia 1-3 3-07 del subgrupo VH3 humano junto con JH4. Una región estructural adecuada para la cadena ligera para el primer dominio variable de cadena ligera (VL1) se obtiene de la secuencia 2-1 1-02 del subgrupo VK1 de la línea germinal humana junto con JK4.

Además, en una región variable de anticuerpo de CDR injertadas de la presente divulgación, las regiones estructurales no tienen que tener exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo aceptador. Por ejemplo, pueden cambiarse restos inusuales por restos que aparecen de forma más frecuente para esa clase o tipo de cadena aceptadora. Como alternativa, pueden cambiarse restos seleccionados en las regiones estructurales

aceptadoras de modo que correspondan con el resto encontrado en la misma posición en el anticuerpo donador (véase, Reichmann *et al.*, 1998, Nature, 332, 323-324). Dichos cambios deben mantenerse al mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donador. Un protocolo para seleccionar restos en las regiones estructurales aceptadoras que pueden tener que cambiarse se expone en el documento WO 91/09967.

Adecuadamente, en la primera región variable de cadena pesada (VH1) de la presente divulgación, si la cadena pesada aceptadora tiene la secuencia 1-3 3-07 de VH3 humana junto con JH4, entonces las regiones estructurales aceptadoras de la cadena pesada comprenden, además de una o más CDR donadoras, un resto donador en al menos una de las posiciones 37, 73, 78 o 94 (de acuerdo con Kabat *et al.*, (*supra*)). Por ejemplo, consiguiente, se proporciona una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico, en la que al menos los restos en las posiciones 37, 73, 78 y 94 del primer dominio variable de la cadena pesada son restos donadores.

Adecuadamente, en la primera región variable de cadena ligera (VL1) de la presente divulgación, si la cadena ligera aceptadora tiene la secuencia 2-1 1-02 del subgrupo VK1 humano junto con JK4, entonces las regiones estructurales aceptadoras de la cadena ligera comprenden, además de una o más CDR donadoras, un resto donador en al menos una de las posiciones 64 o 71. Por ejemplo, consiguiente, se proporciona una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico en la que al menos los restos en las posiciones 64 y 71 del primer dominio variable de la cadena ligera son restos donadores.

Los restos donadores son restos del anticuerpo donador, es decir, el anticuerpo del que se obtienen originalmente las CDR.

En un ejemplo, una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación comprende una cadena pesada, en la que el primer dominio variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>1) comprende la secuencia dada en la figura 2 (b) SEQ ID NO: 8.

Se apreciará que pueden hacerse sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de uno o más aminoácidos, por ejemplo, 1 o 2 aminoácidos, al primer dominio variable de cadena pesada y ligera, proporcionados por la presente divulgación, sin alterar significativamente la capacidad de la proteína de fusión de anticuerpo de unirse a OX40 y de neutralizar la actividad de OX40. El efecto de cualquier sustitución, adición y/o eliminación de aminoácido puede ensayarse fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, usando los métodos descritos en el documento WO 2010/096418, para determinar la unión a OX40 y el bloqueo de ligando.

En un ejemplo, una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación comprende una cadena pesada, en la que el primer dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la figura 2(b) SEQ ID NO: 8. En un ejemplo, una proteína de fusión de anticuerpo de la presente divulgación comprende una cadena pesada (VH1), en la que el primer dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 8.

En un ejemplo, una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación comprende una cadena ligera, en la que el primer dominio variable de la cadena ligera (VL1) comprende la secuencia dada en la figura 2 (a) SEQ ID NO: 7.

En otro ejemplo, una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación comprende una cadena ligera, en la que el primer dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7. En un ejemplo, la proteína de fusión de anticuerpo de la presente divulgación comprende una cadena ligera, en la que el primer dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7.

En un ejemplo, una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación comprende una cadena pesada, en la que el primer dominio variable de la cadena pesada (VH1) comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 8 y una cadena ligera, en la que el primer dominio variable de la cadena ligera (VL1) comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7.

En otro ejemplo de la divulgación, la proteína de fusión de anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en la que el primer dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 8 y el primer dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7. Adecuadamente, la proteína de fusión de anticuerpo comprende una cadena pesada, en la que el primer dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 8 y una cadena ligera, en la que el primer dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7.

En la proteína de fusión de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación, la cadena pesada comprende un dominio CH1 y la cadena ligera comprende un dominio CL, kappa o lambda.

5 En un ejemplo, una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación comprende una cadena pesada, en la que la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 10 y una cadena ligera, en la que la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9.

10 Se apreciará que pueden hacerse sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de uno o más aminoácidos, por ejemplo, 1 o 2 aminoácidos, a los dominios variables y/o constantes del anticuerpo proporcionados por la presente divulgación sin alterar significativamente la capacidad del anticuerpo de unirse a OX40 y de neutralizar la actividad de OX40. El efecto de cualquier sustitución, adición y/o eliminación de aminoácido puede ensayarse fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, usando los métodos descritos en el documento WO 2010096418, para determinar determine la unión a OX40 y el bloqueo de la interacción de OX40/OX40L.

15 En un ejemplo de la divulgación, la proteína de fusión de anticuerpo comprende una cadena pesada, en la que los dominios VH1 y CH1 de cadena pesada comprenden una secuencia que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 10. Adecuadamente, la fusión de anticuerpo comprende una cadena pesada, en la que los dominios VH1 y CH1 de la cadena pesada comprenden una secuencia que tiene al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 10.

20 En un ejemplo, una molécula de fusión de anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente divulgación comprende una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la figura 2(d), SEQ ID NO: 9.

25 En un ejemplo de la divulgación, la proteína de fusión de anticuerpo comprende una cadena ligera, en la que los dominios VL1 y CH1 de la cadena ligera comprenden una secuencia que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9. Por ejemplo, la proteína de fusión de anticuerpo comprende una cadena ligera, en la que los dominios VL1 y CL de la cadena ligera comprenden una secuencia que tiene al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9.

30 El segundo antígeno unido por la proteína de fusión de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación es seroalbúmina humana. Esta se une por la parte Fv del Fab-dsFv que está compuesto del segundo dominio variable de cadena pesada y ligera, VH2 y VL2. En la presente divulgación, VH2 y VL2 se obtienen de uno de los anticuerpos descritos en el documento WO 2010/035012 y representan un injerto mejorado, más humano, de ese anticuerpo.

35 En un ejemplo, el segundo dominio variable de cadena pesada (VH2) tiene la secuencia dada en la figura 3(a) SEQ ID NO: 11.

40 En un ejemplo, el segundo dominio variable de cadena ligera (VL2) tiene la secuencia dada en la figura 3(b) SEQ ID NO: 12.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico que se une a OX40 humano y seroalbúmina humana, que comprende:

45 una cadena pesada que comprende, en secuencia desde el extremo N, un primer dominio variable de cadena pesada (VH1), un dominio CH1 y un segundo dominio variable de cadena pesada (VH2), una cadena ligera que comprende, en secuencia desde el extremo N, un primer dominio variable de cadena ligera (VL1), un dominio CL y un segundo dominio variable de cadena ligera (VL2),

en la que dicha cadena pesada y ligera se alinean de modo que VH1 y VL1 formen un primer sitio de unión a antígeno y VH2 y VL2 formen un segundo sitio de unión a antígeno,

50 en la que el antígeno unido por el primer sitio de unión a antígeno es OX40 humano y el antígeno unido por el segundo sitio de unión a antígeno es seroalbúmina humana,

en la que el primer dominio variable de la cadena pesada (VH1) 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 y el primer dominio variable de la cadena ligera (VL1) 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,

55 en la que el segundo dominio variable de cadena pesada (VH2) tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 11 y el segundo dominio variable de cadena ligera (VL2) tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 12 y

60 el segundo dominio variable de cadena pesada (VH2) y el segundo dominio variable de cadena ligera (VL2) están unidos por un enlace disulfuro.

Preferiblemente, el dominio CH1 y el segundo dominio variable de cadena pesada (VH2) están conectados mediante un conector y el dominio CL y el segundo dominio variable de cadena ligera (VL2) están conectados mediante un conector. Puede usarse cualquier secuencia conectora peptídica adecuada y estas pueden ser iguales en cada cadena o diferentes. Los conectores adecuados se han descrito previamente en el documento WO 2010/035012. Se muestran ejemplos de conectores adecuados en la figura 3 (c) y (d). En un ejemplo, el conector entre el dominio



CH1 y el segundo dominio variable de cadena pesada ( $V_{H2}$ ) comprende o consiste en la secuencia dada en la figura 3 (c) SEQ ID NO: 13. En un ejemplo, el conector entre el dominio CH1 y el segundo dominio variable de cadena pesada ( $V_{H2}$ ) comprende o consiste en la secuencia dada en la figura 3 (c) SEQ ID NO: 14. En un ejemplo, el conector entre el dominio CL y el segundo dominio variable de cadena ligera ( $V_{L2}$ ) comprende o consiste en la secuencia dada en la figura 3(d) SEQ ID NO: 14.

En un ejemplo, el conector en la cadena ligera es una secuencia de 15 aminoácidos, en particular, GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 29).

En un ejemplo, el conector en la cadena pesada es una secuencia de 16 aminoácidos, en particular, SGGGGSGGGGTGGGGGS (SEQ ID NO: 30).

En un ejemplo, la presente divulgación proporciona una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico en que la cadena pesada comprende o consiste en la secuencia dada en la figura 3(e) (SEQ ID NO: 15) y la cadena ligera comprende o consiste en la secuencia dada en la figura 3(f) (SEQ ID NO: 16).

En un ejemplo de la divulgación, la proteína de fusión de anticuerpo biespecífico comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en la que la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15 y la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 16. Generalmente, la fusión de anticuerpo comprende una cadena pesada, en la que la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 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 la que la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 16.

Las moléculas de fusión de anticuerpo de la presente divulgación tienen adecuadamente una alta afinidad de unión, en particular afinidad picomolar por OX40 human y afinidad nanomolar por seroalbúmina humana. La afinidad puede medirse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, BIAcore™, como se describe para OX40 en el documento WO 2010096418 y seroalbúmina en el documento WO 2010/035012, usando OX40 natural o recombinante aislado o seroalbúmina o una proteína/polipéptido de fusión adecuado.

En un ejemplo, la afinidad se mide usando dominio extracelular de OX40 humano recombinante como se describe en el documento WO 2010/096418. En un ejemplo, el dominio extracelular de OX40 humano recombinante usado es un dímero, por ejemplo, un dímero de fusión de Fc. Adecuadamente, las moléculas de fusión de anticuerpo de la presente divulgación tienen una afinidad de unión por OX40 humano aislado de aproximadamente 200 pM o menos. En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente divulgación tiene una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o menos. En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente divulgación tiene una afinidad de unión de aproximadamente 50 pM o menos. En un ejemplo, la molécula de fusión de anticuerpo de la presente divulgación tiene una afinidad de unión de aproximadamente 40 pM o menos.

Las moléculas de fusión de anticuerpo de la presente divulgación tienen adecuadamente una alta afinidad de unión por OX40 humano expresado en la superficie de linfocitos T activados, por ejemplo, afinidad nanomolar o picomolar. La afinidad puede medirse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo el método descrito en el documento WO 2010096418 usando linfocitos T humanos  $CD4^+$   $OX40^+$  activados. En particular, las moléculas de fusión de anticuerpo de la presente divulgación tienen una afinidad de unión por OX40 humano expresado en superficie celular de aproximadamente 2 nM o mejor. En un ejemplo, las moléculas de anticuerpo de la presente divulgación tienen una afinidad de unión por OX40 humano expresado en superficie celular de aproximadamente 1 nM o mejor. En otro ejemplo, las moléculas de anticuerpo de la presente divulgación tienen una afinidad de unión por OX40 humano expresado en superficie celular de aproximadamente 0,5 nM o mejor. En otro ejemplo, las moléculas de anticuerpo de la presente divulgación tienen una afinidad de unión por OX40 humano expresado en superficie celular de aproximadamente 0,2 nM o mejor.

Adecuadamente, las moléculas de fusión de anticuerpo de la presente divulgación tienen una afinidad de unión por seroalbúmina humana aislada de aproximadamente 50 nM o menos. Adecuadamente, las moléculas de fusión de anticuerpo de la presente divulgación tienen una afinidad de unión por seroalbúmina humana aislada de aproximadamente 20 nM o menos. En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente divulgación tiene una afinidad de unión de aproximadamente 10 nM o menos. En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente divulgación tiene una afinidad de unión de aproximadamente 5 nM o menos. En un ejemplo, la molécula de fusión de anticuerpo de la presente divulgación tiene una afinidad de unión de aproximadamente 2 nM o menos.

Las moléculas de fusión de anticuerpo de la presente divulgación pueden unirse a seroalbúmina humana y seroalbúmina de macaco, ratón y rata. En un ejemplo, la proteína de fusión de anticuerpo de la presente divulgación se une a seroalbúmina de macaco con una afinidad de 5 nM o menos. En un ejemplo, la proteína de fusión de anticuerpo de la presente divulgación se une a seroalbúmina de ratón con una afinidad de 5 nM o menos.

Las moléculas de fusión de anticuerpo de la presente divulgación pueden unirse a OX40 humano y seroalbúmina humana simultáneamente.

5 De forma ventajosa, las moléculas de fusión de la presente divulgación tienen una alta afinidad por OX40 y también tienen una semivida adecuada *in vivo* para que sean terapéuticamente útiles, por ejemplo, la semivida está en el intervalo de 5-15 días, tal como 7-11 días.

10 Se apreciará que la afinidad de la proteína de fusión de anticuerpo proporcionada por la presente divulgación por OX40 humano y/o seroalbúmina humana puede alterarse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. La presente divulgación, por lo tanto, también se refiere a variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente divulgación, que tienen una afinidad mejorada por OX40 o seroalbúmina humana. Dichas variantes pueden obtenerse mediante varios protocolos de maduración de afinidad, incluyendo mutación de las CDR (Yang *et al.*, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), reordenamiento de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas mutadoras de *E. coli* (Low *et al.*, J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), reordenamiento de 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.* (*supra*) analiza estos métodos de maduración de la afinidad.

20 En un ejemplo, las moléculas de fusión de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación bloquean la interacción entre OX40 y OX40L. Se describen numerosos ensayos adecuados para determinar la capacidad de un anticuerpo de bloquear esta interacción en el documento WO 2010/096418. En un ejemplo, la presente divulgación proporciona una proteína de fusión de anticuerpo que tiene especificidad por OX40 humano que puede inhibir la unión de OX40L humano (ensayado a una concentración de 2 µg/ ml) a linfocitos T CD4+OX40+ humanos activados en un 50 % a una concentración de menos de 0,5 nM. En un ejemplo, el OX40L humano usado en el ensayo es OX40 humano natural. En un ejemplo, el OX40 humano usado en el ensayo es OX40 humano recombinante.

30 Si se desea, un anticuerpo para su uso en la presente divulgación 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 para formar un único resto que pueda adherirse a los anticuerpos de la presente divulgación. Cuando se desea obtener un fragmento de anticuerpo unido a una molécula efectora, este puede prepararse por procedimientos químicos o de ADN recombinante convencionales en que el fragmento de anticuerpo se une directamente o mediante un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar dichas 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, pág. 623-53; Thorpe *et al.*, 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 y Dubowchik *et al.*, 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO 03/031581. Como alternativa, cuando la molécula efectora es una proteína o polipéptido, la unión puede conseguirse usando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo, como se describe en el documento WO 86/01533 y el documento EP0392745.

40 La expresión molécula efectora, como se usa en este documento, incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo, enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, polímeros sintéticos o de origen natural, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, por ejemplo, ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente radioyodo, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse por RMN o espectroscopia ESR.

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

55 Las moléculas efectoras también incluyen, aunque sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (antiguamente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

65 Otras moléculas efectoras pueden incluir polinucleótidos quelados tales como <sup>111</sup>In y <sup>90</sup>Y, Lu<sup>177</sup>, Bismuto<sup>213</sup>, Californio<sup>252</sup>, Iridio<sup>192</sup> y Tungsteno<sup>188</sup>/Renio<sup>188</sup>; o fármacos tales como, aunque sin limitación, alquilfosfolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina. Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y

enzimas. Enzimas de interés incluyen, aunque sin limitación, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, aunque sin limitación, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, interferón  $\alpha$ , interferón  $\beta$ , factor de crecimiento de nervios, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador de plasminógeno tisular, un agente trombotico o un agente antiangiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina, o un modificador de la respuesta biológica tal como una lincocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento de nervios (NGF) u otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles, por ejemplo, en diagnóstico. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radioactivos, metales de emisión de positrones (para su uso en tomografía de emisión de positrones) y iones metálicos paramagnéticos no radioactivos. Véase, en general, la patente de Estados Unidos n.º 4741900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como agentes de diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y eucorina; y núclidos radioactivos adecuados incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  y  $^{99}\text{Tc}$ .

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

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

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

Polímeros de origen natural específicos incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de los mismos.

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

El tamaño del polímero puede variarse según se desee, pero en general estará en un intervalo de peso molecular promedio de 500 Da a 50 000 Da, por ejemplo, de 5000 a 40 000 Da tal como de 20 000 a 40 000 Da.

En un ejemplo, las moléculas efectoras adecuadas pueden adherirse a través de cualquier cadena lateral de aminoácido o grupo funcional de aminoácido terminal disponible ubicado en la proteína de fusión de anticuerpo, por ejemplo, cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Dichos aminoácidos pueden existir de forma natural en el fragmento de anticuerpo o pueden diseñarse en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (véanse, por ejemplo, los documentos US 5219996; US 5667425; WO 98/25971).

La presente divulgación también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena pesada y/o ligera de una molécula de anticuerpo de la presente divulgación. Adecuadamente, la secuencia de ADN codifica la cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo de la presente divulgación. La secuencia de ADN de la presente divulgación puede comprender ADN sintético, por ejemplo, producido por procesamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos. Las secuencias de ADN que codifican una molécula de anticuerpo de la presente divulgación pueden obtenerse por métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden sintetizarse secuencias de ADN que codifican parte o la totalidad de la cadena pesada y ligera del anticuerpo según se desee desde las secuencias de ADN determinadas o basándose en las secuencias de aminoácidos correspondientes.

El ADN que codifica secuencias estructurales aceptadoras está ampliamente disponible para los expertos en la materia y puede sintetizarse fácilmente basándose en sus secuencias de aminoácidos conocidas.

Pueden usarse técnicas convencionales de biología molecular para preparar secuencias de ADN que codifiquen la molécula de anticuerpo de la presente divulgación. Las secuencias de ADN deseadas pueden sintetizarse completamente o en parte usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Pueden usarse técnicas de mutagénesis dirigida al sitio y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según lo apropiado.

Se proporcionan ejemplos de secuencias adecuadas en la figura 5 (a) SEQ ID NO: 21; figura 5 (b) SEQ ID NO: 22; figura 6 (a) SEQ ID NO: 23; figura 6 (b) SEQ ID NO: 24. Los nucleótidos 1-63 en la SEQ ID NO: 21 y 1-63 en la SEQ ID NO: 23 codifican la secuencia peptídica señal de OmpA que se escinde para dar una molécula de fusión de anticuerpo antagonista de la presente divulgación. La presente divulgación también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena pesada de una proteína de fusión de anticuerpo de la presente divulgación que comprende la SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22. La presente divulgación también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena ligera de una molécula de fusión de anticuerpo de la presente divulgación que comprende la SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24.

Otros ejemplos de secuencias adecuadas se proporcionan en la figura 7 (a) SEQ ID NO: 25; figura 7 (b) SEQ ID NO: 26; figura 8 (a) SEQ ID NO: 27; figura 6 (b) SEQ ID NO: 28. Los nucleótidos 1-57 en la SEQ ID NO: 25 y 1-60 en la SEQ ID NO: 27 codifican la secuencia peptídica señal del anticuerpo B72.3 de ratón (Whittle *et al.*, 1987, Protein Eng. 1(6) 499-505) que se escinde para dar una molécula de fusión de anticuerpo antagonista de la presente divulgación. La presente divulgación también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena pesada de una proteína de fusión de anticuerpo de la presente divulgación que comprende la SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 26. La presente divulgación también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena ligera de una molécula de fusión de anticuerpo de la presente divulgación que comprende la SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 28.

La presente divulgación también se refiere a un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN de la presente divulgación. Por consiguiente, se proporciona un vector de expresión o clonación que comprende una o más secuencias de ADN que codifican una proteína de fusión de anticuerpo de la presente divulgación. Adecuadamente, el vector de clonación o expresión comprende dos secuencias de ADN, que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de la molécula de anticuerpo de la presente divulgación, respectivamente. Adecuadamente, un vector de acuerdo con la presente divulgación comprende las secuencias dadas en la SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23. Los nucleótidos 1-63 en la SEQ ID NO: 21 y 1-63 en la SEQ ID NO: 23 codifican la secuencia peptídica señal de OmpA.

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

También se proporciona una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de clonación o expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican una proteína de fusión de anticuerpo de la presente divulgación. Puede usarse cualquier sistema de célula hospedadora/vector adecuado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente divulgación. Pueden usarse sistemas bacterianos, por ejemplo, de *E. coli*, y otros microbianos o también pueden usarse sistemas de expresión de células hospedadoras eucariotas, por ejemplo, de mamífero. Las células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen células CHO, de mieloma o de hibridoma.

La presente divulgación también proporciona un proceso para la producción de una molécula de fusión de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación, que comprende cultivar una célula hospedadora que contiene un vector de la presente divulgación en condiciones adecuadas para dar lugar a la expresión de proteína a partir de ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente divulgación, y aislar la molécula de anticuerpo.

Para la producción de productos que comprende tanto cadena pesada como 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, puede usarse un único vector, incluyendo el vector secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y cadena pesada.

Como las proteínas de fusión de anticuerpo de la presente divulgación son útiles en el tratamiento y/o profilaxis de una afección patológica, la presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende una molécula de anticuerpo de la presente divulgación en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, se proporciona el uso de una proteína de fusión de anticuerpo de la divulgación para la fabricación de un medicamento. La composición habitualmente se aportará como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente divulgación puede comprender adicionalmente un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

La presente divulgación también proporciona un proceso para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico, que comprende añadir o mezclar la molécula de fusión de anticuerpo de la presente divulgación junto con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

10 En un ejemplo adicional, la proteína de fusión de anticuerpo o composición de acuerdo con la divulgación se emplea en combinación con un agente farmacéuticamente activo adicional, por ejemplo, un corticoesteroide (tal como propionato de fluticasona) y/o un agonista de beta-2 (tal como salbutamol, salmeterol o formoterol) o inhibidores del crecimiento y la proliferación celular (tal como rapamicina, ciclofosfamida, metotrexato) o como alternativa un inhibidor de CD28 y/o CD40. En un ejemplo, el inhibidor es una molécula pequeña. En otro ejemplo, el inhibidor es un anticuerpo específico para la diana.

15 Las composiciones farmacéuticas adecuadamente comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de anticuerpo de la divulgación. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en este documento, se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección diana, o para mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la cantidad terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, habitualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también puede usarse para determinar el intervalo de concentración y vía de administración apropiados. Dicha información entonces puede usarse para determinar dosis y vías de administración útiles en seres humanos.

25 La cantidad terapéuticamente eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado patológico, la salud general del sujeto, la edad, peso y género del sujeto, la dieta, tiempo y frecuencia de administración, la combinación o combinaciones de fármacos, las sensibilidades de reacción y tolerancia/respuesta al tratamiento. Esta cantidad puede determinarse por experimentación rutinaria y pertenece a los criterios del médico. Generalmente, 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 monodosis que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la divulgación por dosis.

30 Las composiciones pueden administrarse individualmente a un paciente o pueden administrarse en combinación (por ejemplo, simultáneamente, secuencialmente o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas.

35 La dosis a la que la molécula de fusión de anticuerpo de la presente divulgación se administra depende de la naturaleza de la afección a tratar, el grado de la inflamación presente y de si la molécula de anticuerpo se está usando de forma profiláctica o para tratar una afección existente.

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

45 El vehículo farmacéuticamente aceptable no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivo.

50 Pueden usarse 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.

55 Los vehículos farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Además, puede haber presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponantes del pH, en dichas composiciones. Dichos vehículos posibilitan que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, píldoras, grajeas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, papillas y suspensiones, para su ingesta por el paciente.

60 Las formas adecuadas para administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo, por inyección o infusión, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede adoptar 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 antes de su uso con un líquido estéril apropiado.

65

Una vez formuladas, las composiciones de la divulgación pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales. Sin embargo, en uno o más ejemplos, las composiciones se adaptan para su administración a sujetos humanos.

5 Adecuadamente en formulaciones de acuerdo con la presente divulgación, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento, por ejemplo, si el pH de la formulación es 7, entonces puede ser apropiado un pl de 8-9 o por encima. Aunque sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se cree esto puede proporcionar en último lugar una formulación final con estabilidad mejorada, por ejemplo, el anticuerpo o fragmento permanece en solución.

10 En un aspecto, ventajosamente la molécula de fusión de la presente divulgación no tiene un pl que corresponde a una molécula neutra global. Esto hace que la molécula sea menos susceptible a agregación.

15 Las composiciones farmacéuticas de esta divulgación pueden administrarse por innumerables vías incluyendo, aunque sin limitación, vía oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase el documento WO 98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También pueden usarse hipoaerosoles para administrar las composiciones farmacéuticas de la divulgación. Típicamente, las composiciones terapéuticas pueden prepararse como inyectables, como soluciones líquidas o suspensiones. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de su inyección.

20 El suministro directo de las composiciones en general se conseguirá mediante inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se suministrará al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también pueden administrarse a una lesión. La pauta posológica puede ser una pauta de una dosis o una pauta de múltiples dosis.

25 Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Por tanto, será susceptible a degradación en el tubo gastrointestinal. Por tanto, si la composición a administrar por una vía usando el tubo gastrointestinal, la composición tendrá que contener agentes que protejan el anticuerpo de la degradación, pero que liberen el anticuerpo una vez se haya absorbido del tubo gastrointestinal.

30 Hay un análisis minucioso de vehículos farmacéuticamente aceptables disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

35 En un ejemplo, la formulación se proporciona como una formulación para administraciones tópicas, incluyendo inhalación.

40 Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles dosificadores que contienen gases propulsores o soluciones inhalables sin gases propulsores. Los polvos inhalables de acuerdo con la divulgación que contienen la sustancia activa pueden consistir únicamente de las sustancias activas mencionadas anteriormente o de una mezcla de las sustancias activas mencionadas anteriormente con excipiente fisiológicamente aceptable.

45 Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (por ejemplo, glucosa o arabinosa), disacáridos (por ejemplo, lactosa, sacarosa, maltosa), oligo- y polisacáridos (por ejemplo, dextranos), polialcoholes (por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo, cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de estos con otro. Se usan adecuadamente mono- o disacáridos, el uso de lactosa o glucosa, particularmente, pero no exclusivamente en forma de sus hidratos.

50 Las partículas para depósito en el pulmón requieren un tamaño de partícula de menos de 10 micrómetros, tal como 1-9 micrómetros, por ejemplo, de 0,1 a 5  $\mu\text{m}$ , en particular de 1 a 5  $\mu\text{m}$ . El tamaño de partícula del ingrediente activo (tal como el anticuerpo o fragmento) es de importancia primordial.

55 Los gases propulsores que pueden usarse para preparar los aerosoles inhalables son conocidos en la técnica. Los gases propulsores adecuados se seleccionan 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 pueden usarse por sí mismos o en mezclas de los mismos.

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

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

Los aerosoles inhalables que contienen gas propulsor de acuerdo con la divulgación pueden contener hasta un 5 % en peso de sustancia activa. Los aerosoles de acuerdo con la divulgación contienen, por ejemplo, de un 0,002 a un 5 % en peso, de un 0,01 a un 3 % en peso, de un 0,015 a un 2 % en peso, de un 0,1 a un 2 % en peso, de un 0,5 a un 2 % en peso o de un 0,5 a un 1 % en peso de ingrediente activo.

Como alternativa, las administraciones tópicas al pulmón también pueden ser mediante administración de una solución líquida o formulación en suspensión, por ejemplo, empleando 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.).

La proteína de fusión de anticuerpo de la divulgación puede suministrarse dispersado en un disolvente, por ejemplo, en forma de una solución o una suspensión. Puede suspenderse en una solución fisiológica apropiada, por ejemplo, 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 de sodio, 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, para conseguir un pH de aproximadamente 4,0 a 5,0. Una suspensión puede emplear, por ejemplo, anticuerpo liofilizado.

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

Esto puede incluir la producción y esterilización por filtración del disolvente/solución tamponada usada para la formulación, suspensión aséptica del anticuerpo en la solución de disolvente tamponado estéril y la distribución de la formulación en receptáculos estériles por métodos habituales para los expertos en la materia.

La formulación nebulizable de acuerdo con la presente divulgación puede proporcionarse, por ejemplo, como unidades monodosis (por ejemplo, recipientes de plástico o viales sellados) envasados en envolturas de lámina metalizada. Cada vial contiene una monodosis en un volumen, por ejemplo, 2 ml, de disolvente/tampón de solución.

Las proteínas de fusión de anticuerpo divulgadas en este documento pueden ser adecuadas para su suministro mediante nebulización.

También se prevé que el anticuerpo de la presente divulgación puede administrarse mediante el uso de genoterapia. Para conseguir esto, se introducen secuencias de ADN que codifican la cadena pesada y ligera de la molécula de anticuerpo bajo el control de componentes de ADN apropiados en un paciente de modo que las cadenas de anticuerpo se expresen desde las secuencias de ADN y se ensamblen *in situ*.

La presente divulgación también proporciona una molécula de fusión de anticuerpo (o composiciones que comprenden la misma) para su uso en el control de enfermedades inflamatorias, por ejemplo, enfermedad inflamatoria aguda o crónica. Adecuadamente, la molécula de anticuerpo (o composiciones que comprenden la misma) puede usarse para reducir el proceso inflamatoria o para evitar el proceso inflamatorio. En un ejemplo, se proporciona una reducción *in vivo* de linfocitos T activados, en particular los implicados en respuestas inmunitarias inflamatorias inapropiadas, por ejemplo, reclutas a las cercanías/ubicación de dicha respuesta.

La reducción de los linfocitos T activados, como se emplea en este documento, puede ser una reducción de un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o más por ciento en comparación con antes del tratamiento o sin tratamiento. De forma ventajosa, el tratamiento con un anticuerpo, fragmento o composición de acuerdo con la presente divulgación, puede permitir la reducción en el nivel de linfocitos T activados, sin reducir el nivel general en los pacientes de linfocitos T (linfocitos T inactivados). Esto puede provocar menos efectos secundarios y, posiblemente, puede evitar la reducción de linfocitos T en el paciente.

La presente divulgación también proporciona la molécula de fusión de anticuerpo de la presente divulgación para su uso en el tratamiento o profilaxis de un trastorno patológico que está mediado por OX40 o asociado con 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 inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, colecistopatía, enfermedad pilonidal, peritonitis, psoriasis, vasculitis, adhesiones quirúrgicas, apoplejía, diabetes de tipo I, enfermedad de Lyme, artritis, meningoencefalitis, uveítis autoinmunitaria, trastornos inflamatorios mediados por el sistema inmunitario del sistema nervioso central y periférico tal como esclerosis múltiple, lupus (tal como lupus eritematoso diseminado y nefritis lúpica) y síndrome de Guillain-Barre, dermatitis atópica, hepatitis autoinmunitaria,

5 alveolitis fribrosante, enfermedad de Graves, nefropatía por IgA, púrpura trombocitopénica hepática, enfermedad de Meniere, pénfigo, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, otros trastornos autoinmunitarios, pancreatitis, traumatismo (cirugía), enfermedad de injerto contra hospedador, rechazo de trasplante, cardiopatía incluyendo enfermedades isquémicas tales como infarto de miocardio, así como aterosclerosis, coagulación intravascular, resorción ósea, osteoporosis, osteoartritis, periodontitis e hipoclorhidria.

10 En un ejemplo, la proteína de fusión de anticuerpo de acuerdo con la divulgación se emplea en el tratamiento de alergia, EPOC, enfermedad autoinmunitaria, artritis reumatoide, asma, enfermedad de injerto contra hospedador, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, lupus eritematoso diseminado, nefritis lúpica, miastenia grave, enfermedad de Graves, rechazo de trasplante, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schonlein, esclerosis diseminada o inflamación pulmonar inducida por virus.

15 En un ejemplo, la proteína de fusión de anticuerpo de acuerdo con la divulgación se emplea en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en alergia, EPOC, enfermedad autoinmunitaria, artritis reumatoide, asma, enfermedad de injerto contra hospedador, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, lupus eritematoso diseminado, nefritis lúpica, miastenia grave, enfermedad de Graves, rechazo de trasplante, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schonlein, esclerosis diseminada e inflamación pulmonar inducida por virus.

20 La presente divulgación también proporciona una molécula de fusión de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación para su uso en el tratamiento o profilaxis de dolor, particularmente dolor asociado con inflamación.

25 En un ejemplo, el mecanismo a través del que las moléculas de fusión de la presente divulgación trabajan incluye uno o más de inhibición de proliferaciones o supervivencia de linfocitos T, potenciación de la generación de TReg, diferenciación reducida de linfocitos B y/o producción disminuida de citocinas.

30 La presente divulgación proporciona además el uso de una molécula de fusión de anticuerpo o composición de acuerdo con la presente divulgación en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de un trastorno patológico que está mediado por OX40 o asociado con un nivel aumentado de OX40, en particular el trastorno patológico es artritis reumatoide, asma o EPOC.

35 La presente divulgación proporciona además el uso de una molécula de anticuerpo, fragmento o composición de acuerdo con la presente divulgación en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una o más indicaciones médicas descritas en este documento.

40 Una molécula de fusión de anticuerpo o composición de la presente divulgación puede utilizarse en cualquier tratamiento donde se desee reducir los efectos de OX40 en el organismo humano o animal. OX40 puede estar circulando en el organismo o puede estar presente a un nivel indeseablemente elevado localizado en un sitio particular en el organismo, por ejemplo, un sitio de inflamación.

45 En un ejemplo, la molécula de fusión de anticuerpo de la presente divulgación o una composición que comprende la misma se usa para el control de enfermedad inflamatoria, por ejemplo, como se describe en este documento.

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

50 En un ejemplo, se proporciona una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico purificada que se une a OX40 humano y seroalbúmina humana, en forma sustancialmente purificada, en particular libre o sustancialmente libre de endotoxina y/o proteína o ADN de la célula hospedadora.

55 La forma purificada, como se usa *supra*, pretende hacer referencia a al menos un 90 % de pureza, tal como un 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % p/p o más pura.

En general se pretende que sustancialmente libre de endotoxina haga referencia a un contenido de endotoxina de 1 UE per mg de producto de anticuerpo o menos tal como 0,5 o 0,1 UE por mg de producto.

60 En general se pretende que sustancialmente libre de proteína o ADN de células hospedadora haga referencia al contenido de proteína o ADN de la célula hospedadora de 400 µg por mg de producto de anticuerpo o menos, tal como 100 µg por mg o menos, en particular 20 µg por mg, según lo apropiado.

65 La molécula de fusión de anticuerpo de la presente divulgación también puede usarse en diagnóstico, por ejemplo, en el diagnóstico *in vivo* y formación de imágenes de estados patológicos que implican OX40.



De forma ventajosa, se cree que las presentes moléculas de fusión son seguras para su administración a seres humanos a una dosis terapéutica apropiada, en particular porque no son superagonistas y no es probable que causen tormenta de citocinas.

5 Superagonista, como se emplea en este documento, se refiere a un anticuerpo que expande los linfocitos T en ausencia de acoplamiento de TCR.

En un ejemplo, Fab-Fv A26 reduce el índice de división, que indica que menos células en la población están comprometidas para su división; este efecto está mediado presumiblemente por los linfocitos NK que están expresando OX40. El índice de división representa el número promedio de divisiones celulares que una célula en la población original ha experimentado e incluye las células no divididas.

El índice de proliferación refleja la proliferación de la población que responde únicamente y, en un ejemplo, el efecto inhibidor de Fab-Fv A26 usando esta medida se reduce relativamente.

15 Comprendiendo en el contexto de la presente memoria descriptiva pretende indicar incluyendo.

Cuando sea técnica apropiado, los ejemplos de la divulgación pueden combinarse.

20 En este documento se describen ejemplos que comprenden determinadas características/elementos. La divulgación también se amplía a ejemplos diferentes que consisten o consisten esencialmente en dichas características/elementos.

La presente divulgación se describe además a modo de ilustración únicamente en los siguientes ejemplos, que se refieren a las figuras adjuntas, en que:

### Ejemplos

Figuras en detalle:

30 Figura 1: Una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación, mencionada como Fab-dsFv.

Figura 2:

- 35 a) Región V de cadena ligera de anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 7)
- b) Región V de cadena pesada de anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 8)
- 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) y CDRL3 (SEQ ID NO: 6) de anticuerpo A26.
- d) Cadena ligera de componente Fab de anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 9)
- 40 e) Cadena pesada de componente Fab de anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 10)

Figura 3

- a) Cadena pesada de componente Fv antialbúmina 645 gH5 (SEQ ID NO: 11)
- b) Cadena ligera de componente Fv antialbúmina 645 gL4 (SEQ ID NO: 12)
- 45 c) Conector 1 (SEQ ID NO: 13)
- d) Conector 2 (SEQ ID NO: 14)
- e) Cadena pesada de Fab-dsFv (SEQ ID NO: 15)
- f) Cadena ligera de Fab-dsFv (SEQ ID NO: 16)

Figura 4

- 50 a) Dominio variable de cadena pesada 645 g1 (SEQ ID NO: 17)
- b) Dominio variable de cadena ligera 645 g1 (SEQ ID NO: 18)
- c) Fab-dsFv de A26 645 gH1 (SEQ ID NO: 19)
- d) Fab-dsFv de A26 645 gL1 (SEQ ID NO: 20)

Figura 5

- a) ADN que codifica la cadena pesada del Fab-dsFv incluyendo el líder de OmpA (SEQ ID NO: 21)
- b) ADN que codifica la cadena pesada del Fab-dsFv sin el líder de OmpA (SEQ ID NO: 22)

Figura 6

- 60 a) ADN que codifica la cadena ligera del Fab-dsFv incluyendo el líder de OmpA (SEQ ID NO: 23)
- b) ADN que codifica la cadena ligera del Fab-dsFv con el líder de OmpA (SEQ ID NO: 24)

Figura 7

- 65 a) ADN que codifica la cadena pesada del Fab-dsFv incluyendo el líder de B72.3 (SEQ ID NO: 25)
- b) ADN que codifica la cadena pesada del Fab-dsFv sin el líder de B72.3 (SEQ ID NO: 26)

Figura 8

- a) ADN que codifica la cadena ligera del Fab-dsFv incluyendo el líder de B72.3 (SEQ ID NO: 27)  
 b) ADN que codifica la cadena ligera del Fab-dsFv sin el líder de B72.3 (SEQ ID NO: 28)

5 La figura 9a muestra la unión de Fab-dsFv A26 marcado con AlexaFluor 488 a linfocitos T CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> humanos activados

La figura 9b muestra la unión de Fab' A26, Fab-Fv A26 y Fab' A26-PEG en presencia de un 5 % de HSA en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, OX40<sup>+</sup> humanos activados

10 La figura 10a muestra el efecto de Fab-dsFv A26 sobre la producción de citocinas a partir de PBMC expuestos a extracto alérgico de *Dermatophagoides pteronyssinus*

15 La figura 10b muestra la capacidad de Fab-dsFv A26 de inhibir la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en un modelo de ratón de Hu-NSG

La figura 11a muestra la inhibición de la unión de OX40L a linfocitos T CD4<sup>+</sup> OX40<sup>+</sup> humanos activados por Fab-dsFv A26

20 La figura 11b muestra la inhibición de la unión de OX40L a linfocitos T CD4<sup>+</sup> OX40<sup>+</sup> humanos activados por Fab' A26, Fab-dsFv A26, Fab' A26-PEG y dos controles.

La figura 12a muestra que Fab-Fv A26 inhibe una reacción de linfocitos mixtos (MLR) humana

25 La figura 12b muestra que Fab-Fv A26 inhibe la producción de IFN-gamma durante una MLR humana

La figura 13 muestra que Fab-Fv A26 reduce el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (CD25<sup>+</sup>) activados después de reestimulación con antígeno secundario con extracto alérgico de *Dermatophagoides pteronyssinus*

30 La figura 14 muestra que Fab-Fv y Fab-PEG administrados antes de la transferencia celular inhibe de forma dependiente de la dosis la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en el modelo de Hu-NSG

*Manipulaciones de ADN y métodos generales*

35 Se usaron cepas de *E. coli* competentes para las transformaciones y el crecimiento en cultivo rutinario. Las enzimas de restricción y modificación del ADN se obtuvieron de Roche Diagnostics Ltd. y New England Biolabs. Se realizaron preparaciones plasmídicas usando kits de purificación Maxi Plasmid (QIAGEN, catálogo n.º 12165). Las reacciones de secuenciación de ADN se realizaron usando el kit de secuenciación de terminador ABI Prism Big Dye (catálogo n.º 4304149) y se ejecutaron en un secuenciador automatizado ABI 3100 (Applied Biosystems). Los datos se analizaron usando el programa Sequencher (Genecodes). Los oligonucleótidos se obtuvieron de Simga o Invitrogen. Los genes que codifican las secuencias de región V iniciales se construyeron mediante una estrategia de síntesis automatizada por DNA2.0, y se modificaron para generar las versiones injertadas por mutagénesis dirigida por oligonucleótido. La concentración de Fab-Fv se determinó por un método de HPLC basado en proteína G.

45 **Ejemplo 1**

Generación y análisis de diferentes injertos de humanización de 645 en Fab A26-645dsFv

50 Se ha descrito previamente el formato de anticuerpo Fab-dsFv (figura 1) (a veces mencionado en este documento simplemente como Fab-Fv) y un anticuerpo humanizado antialbúmina conocido como "645gH1gL1" en el documento WO 2010/035012. También se ha descrito previamente la generación de un anticuerpo humanizado anti-OX40 antagonista conocido como "A26" y un fragmento Fab' PEGilado del mismo en el documento WO 2010/096418. Aquí se describe la generación de un nuevo injerto humanizado mejorado del anticuerpo "645" conocido como 645dsgH5gL4 y la generación de una molécula de anticuerpo Fab-dsFv que incorpora ese injerto en el componente Fv y las regiones variables de "A26" en el componente Fab. Las regiones variables de A26 se dan en la figura 2a y b (SEQ ID NO: 7 y 8). Las secuencias de región variable y constante de A26 combinadas se dan en la figura 2d y e (SEQ ID NO: 9 y 10).

60 Las secuencias de 645 gH1 y gL1 se dan en la figura 4(a) y (b), SEQ ID NO: 17 y 18. Cuando se usa el término Fab'-PEG o Fab' A26-PEG este se refiere al Fab A26-PEG 40K descrito en el documento WO 2010/096418.

1.1 Construcción de plásmidos de Fab A26-645dsFv(gH1gL1) y Fab A26-645dsFv(gH5gL4)conector G4S

65 La región codificante total de la cadena ligera de Fab A26-645dsFv(gL1) (SEQ ID NO: 20) se clonó en un vector de expresión de mamífero UCB bajo el control del promotor de HCMV-MIE y la secuencia de poliA de SV40E. La región variable de cadena ligera de 645dsFv(gL1) (SEQ ID NO: 18) se mutó en 645dsFv(gL4) (SEQ ID NO: 12) mediante

un método de PCR solapante. La región codificante total de la cadena pesada de Fab A26-645dsFv(gH1) (SEQ ID NO: 19) se clonó en un vector de expresión de mamífero UCB bajo el control del promotor de HCMV-MIE y la secuencia de poliA de SV40E. La región variable de cadena pesada de 645dsFv(gH1) (SEQ ID NO: 17) se mutó en 645dsFv(gH5) (SEQ ID NO: 11) mediante un método de PCR solapante. Las construcciones se verificaron por secuenciación. Ambas construcciones contenían el conector 3xG4S dado en la SEQ ID NO: 14, figura 3(d).

### 1.2 Expresión en mamífero de Fab A26-645dsFv(gH1gL1) y Fab A26-645dsFv(gH5gL4)

Se transfectaron células HEK293 con los plásmidos de cadena pesada y ligera usando el reactivo de transección 293fectin de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se incubaron 25 µg de plásmido de cadena pesada y 25 µg de plásmido de cadena ligera con 100 µl de 293fectin y 1700 µl de medio Optipro durante 20 min a TA. La mezcla entonces se añadió a  $50 \times 10^6$  células HEK293 en 50 ml de suspensión y se incubó durante 6 días con agitación a 37 °C. Después de 6 días, el sobrenadante se recogió por centrifugación a 1500xg durante 10 minutos para retirar las células y después se filtró a esterilidad a 0,22 µm.

### 1.3 Purificación por proteína G de Fab A26-645dsFv(gH1gL1) y Fab A26-645dsFv(gH5gL4)

Los ~50 ml de sobrenadantes filtrados a 0,22 µm se concentraron hasta ~2 ml usando concentradores Amicon Ultra-15 con una membrana de punto de corte de 10 kDa de peso molecular y centrifugación a 4000xg en un rotor oscilante. Se aplicaron 1,8 ml de sobrenadante concentrado a 1 ml/min a una columna de 1 ml de Gammabind Plus Sepharose (GE Healthcare) equilibrada en fosfato 20 mM, NaCl 40 mM pH 7,4. La columna se lavó con fosfato 20 mM, NaCl 40 mM pH 7,4 y el material unido se eluyó con glicina 0,1 M/HCl pH 2,7. El pico de elución se recogió y el pH se ajustó a ~pH 7 con Tris 2 M/HCl pH 8,5. La elución de pH ajustado se concentró y diafiltró en fosfato 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,4 usando concentradores Amicon Ultra-15 con una membrana de corte de 10 kDa de peso molecular y centrifugación a 4000xg en un rotor oscilante, hasta un volumen final de ~0,3 ml.

### 1.4 Análisis por exclusión de tamaños de Fab A26-645dsFv(gH1gL1) y Fab A26-645dsFv(gH5gL4)

Las muestras purificadas por proteína G se analizaron por HPLC por exclusión de tamaños. Las muestras se separaron en una columna Superdex 200 10/300 GL Tricorn (GE Healthcare) revelada con un gradiente isocrático de PBS pH 7,4 a 1 ml/min. La detección del pico fue a 280 nm y el peso molecular aparente se calculó por comparación con una curva patrón de proteínas de peso molecular conocido frente al volumen de elución. Cambiar el injerto de humanización del 645dsFv de gH1gL1 a gH5gL4 provocó un aumento en el porcentaje de monómero del Fab A26-645dsFv expresado de un 59 % a un 71 %, un aumento de un 12 %, sin ningún cambio en la estabilidad térmica del dsFv (datos no mostrados) o en la afinidad de unión del dsFv a HSA (datos no mostrados).

## Ejemplo 2

### 2.1 Cinética BIAcore para Fab A26-dsFv (645gH5gL4) que se une a OX40

En este y todos los ejemplos posteriores el Fab A26-645dsFv(gH5gL4) tenía la secuencia de cadena pesada dada en la SEQ ID NO: 15 (figura 3 (e)) y la secuencia de cadena ligera dada en la SEQ ID NO: 16 (figura 3(f)), es decir, la cadena pesada contenía el conector G4S, G4T, G4S dado en la SEQ ID NO: 13, figura 3 (c).

Se realizó BIA (análisis de interacciones biomoleculares) usando un BIAcore T200 (GE Healthcare). Se inmovilizó un fragmento F(ab')<sub>2</sub> purificado por afinidad de cabra anti-IgG humana, específico de fragmento F(ab')<sub>2</sub> (Jackson ImmunoResearch) en un chip detector CM5 mediante química de acoplamiento amina a un nivel de captura de ≈5000 unidades de respuesta (UR). Se usó tampón HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %, GE Healthcare) como tampón de ejecución con un caudal de 10 µl/min. Se usó una inyección de 10 µl de Fab' A26 a 0,5 µg/ml o Fab A26-dsFv a 1 µg/ml para la captura mediante el anticuerpo inmovilizado anti-IgG humana-F(ab')<sub>2</sub>. Se tituló OX40 humano sobre el A26 capturado a diversas concentraciones (25 nM a 1,5625 nM) a un caudal de 30 µl/min. La superficie se regeneró mediante 2 x 10 µl de inyección de HCl 50 mM, seguido de una inyección de 5 µl de NaOH 5 mM a un caudal de 10 µl/min. Se analizaron curvas de unión de sustracción del fondo usando el programa informático T200evaluation (versión 1.0) siguiendo procedimientos convencionales. Los parámetros cinéticos se determinaron de partir del algoritmo de ajuste.

Tabla 1

Muestra	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	KD(pM)
Fab'	2,18 ± 0,38 E+05	1,00 E-05	4,68E-11	46,8
Fab-Fv	2,55 ± 0,35 E+05	1,04 E-05	4,12E-11	41,2
Fab' PEG	2,33 ± 0,46 E+05	1,12 E-05	4,84E-11	48,4

Promedio de 4 determinaciones

## 2.2 Cinética BIAcore para Fab A26-dsFv (645gH5gL4) que se une a albúmina

Se realizó BIA (análisis de interacciones biomoleculares) usando un BIAcore T200 (GE Healthcare). Se inmovilizó un fragmento F(ab')<sub>2</sub> purificado por afinidad de cabra anti-IgG humana, específico de fragmento F(ab')<sub>2</sub> (Jackson ImmunoResearch) en un chip detector CM5 mediante química de acoplamiento amina a un nivel de captura de ≈5000 unidades de respuesta (UR). Se usó tampón HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensoactivo P20 al 0,05 %, GE Healthcare) como tampón de ejecución con un caudal de 10 µl/min. Se usó una inyección de 10 µl de Fab-Fv a 0,75 µg/ml para la captura mediante el anticuerpo inmovilizado anti-IgG humana-F(ab')<sub>2</sub>. Se tituló seroalbúmina humana (HSA), seroalbúmina de ratón (MSA) y seroalbúmina de macaco (CSA) sobre el Fab-Fv capturado a diversas concentraciones (50 nM a 6,25 nM) a un caudal de 30 µl/min. La superficie se regeneró mediante 2 x 10 µl de inyección de HCl 50 mM, seguido de una inyección de 5 µl de NaOH 5 mM a un caudal de 10 µl/min. Se analizaron curvas de unión de sustracción del fondo usando el programa informático T200evaluation (versión 1.0) siguiendo procedimientos convencionales. Los parámetros cinéticos se determinaron a partir del algoritmo de ajuste.

Tabla 2

Muestra	ka(1/MS)	kd(1/s)	KD(M)	KD(nM)
HSA	5,84 E+04	1,63 E-04	2,93E-09	2,93
MSA	8,86 E+04	3,68 E-04	4,16E-09	4,16
CSA	7,1 E+04	1,89 E-04	2,66E-09	2,66

Promedio de 3 determinaciones

## 2.3 Demostración de la unión de Fab A26-dsFv(645gH5gL4) a OX40 y albúmina simultáneamente

Se evaluó la unión simultánea de OX40 humano y seroalbúmina humana a Fab A26-dsFv. La construcción de Fab A26-dsFv se capturó en la superficie del chip detector como se indica en el método para la cinética BIAcore para la unión de Fab A26-dsFv a albúmina. Se tituló HAS 50 nM, OX40 25 nM o una solución mixta con concentración final de HSA 50 nM y OX40 25 nM por separado sobre el Fab A26-dsFv capturado. La respuesta de unión para la solución combinada de HSA/OX40 fue equivalente a la suma de las respuestas de las inyecciones independientes. Esto confirma que el Fab-dsFv puede unirse simultáneamente tanto a OX40 humano como a HSA.

Tabla 3

Muestra	Analito	Unión (UR)
Fab A26-Fv	hOX40	25
	HSA	9
	hOX40 + HSA	<b>35 (34)</b>

## 2.4 Afinidad basada en células de Fab A26-dsFv (645gH5gL4)

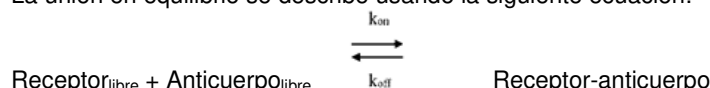
Métodos:

Unión de Fab A26-Fv a linfocitos T CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> humanos activados

Se aislaron PBMC por separación en un gradiente de Ficoll y se activaron con 4 µg/ml de PHA-L durante 3 días a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, 100 % de humedad. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se aislaron por selección negativa usando microesferas magnéticas (kit de aislamiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> II para seres humanos; Miltenyi Biotec). Se incubaron aproximadamente 1 x 10<sup>5</sup> células en presencia de anticuerpo en tampón Facs (PBS/BSA al 0,2 %/NaN<sub>3</sub> al 0,09 %) o tampón Facs complementado con HSA al 5 % a 4 °C. La concentración final del anticuerpo varió de 48 nM - 0,0005 nM). Las células se lavaron en PBS antes del análisis por citometría de flujo usando un FACScalibur (Becton Dickinson). Se produjeron dos conjuntos de datos de titulación en ambas condiciones de tampón, una con Fab A26-dsFv y la segunda con un Fab-Fv de control irrelevante para determinar la unión no específica. El número de moles de anticuerpo unido se calculó usando valores interpolados a partir de una curva patrón generada mediante el uso de microesferas que comprenden cantidades diferentes, pero conocidas de tinte fluorescente. Se determinaron las medias geométricas de los valores de fluorescencia en los análisis citométricos de flujo de células y microesferas. La unión no específica se sustrajo de los valores de Fab A26-dsFv y la curva de unión específica así generada se analizó por regresión no lineal usando una ecuación de unión de un sitio (Graphpad Prism®) para determinar la K<sub>D</sub>.

Para determinar la afinidad de Fab A26-dsFv por el antígeno expresado en superficie celular, se realizaron experimentos de unión en saturación usando linfocitos T CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> activados, y Fab A26-dsFv marcado con Alexa Fluor 488. Se usó la unión específica del anticuerpo al receptor en equilibrio a través de un intervalo de concentraciones de anticuerpo para determinar la K<sub>D</sub>, suponiendo que solamente una fracción muy pequeña de anticuerpo se unió al receptor en cualquier punto en la curva de unión.

La unión en equilibrio se describe usando la siguiente ecuación:



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

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

En equilibrio, las velocidades de asociación y disociación son iguales y puede derivarse una ecuación que describe la isoterma de unión; en un diagrama semilog la unión es sigmoidea. La  $K_D$  se define por  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  y puede calcularse a partir de la curva de unión como la concentración a la que se produce la unión que es la mitad de la máxima.

La unión de Fab A26-Fv marcado con AlexaFluor488 a linfocitos T CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> humanos activados se midió por citometría de flujo a través de un intervalo de concentración de 5-log.

Se muestra una curva de unión representativa para Fab A26-Fv en la figura 9A.

El valor medio de  $K_D$  obtenido en células activadas de 5 donadores diferentes es 145 pM.

Se muestra una curva de unión comparadora para Fab A26, Fab A26-Fv y Fab A26-PEG en la figura 9B.

Los gráficos representan la media de 4 o 5 experimentos donde se usó un donador diferente en cada experimento.

Se aislaron PBMC por separación en un gradiente de Ficoll y se activaron con 4 µg/ml de PHA-L durante 3 días a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, 100 % de humedad. Después de esto, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se aislaron por selección negativa usando microesferas magnéticas (kit de aislamiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> II para seres humanos; Miltenyi Biotec). Se incubaron aproximadamente  $1 \times 10^5$  células en presencia de anticuerpo en tampón Facs (PBS/BSA al 0,2 %/NaN3 al 0,09 %) o tampón Facs complementado con HSA al 5 %, a 4 °C. La concentración final del anticuerpo varió de 48 nM - 0,0005 nM. Las células se lavaron en PBS antes del análisis por citometría de flujo usando un FACScalibur (Becton Dickinson). También se produjeron conjuntos de datos de titulación para anticuerpos de control de isotipo para cada formato A26 para determinar la unión no específica. El número de moles de anticuerpo unido se calculó usando valores interpolados de una curva patrón generada a partir de microesferas que comprenden cantidades diferentes, pero conocidas de tinte fluorescente. La media geométrica de los valores de fluorescencia se determinó en los análisis citométricos de flujo de células y microesferas. La unión no específica se sustrajo de los valores de Fab A26-Fv y la curva de unión específica así generada se analizó por regresión no lineal usando una ecuación de unión de un sitio (Graphpad Prism®) para determinar la  $K_D$ .

Tabla 4: Valores medios de  $K_D$  para anticuerpos A26 en ensayos de afinidad de células humanas

Formato de anticuerpo	Afinidad celular HSA $K_D$ (nM) ± E.T.M.	Afinidad celular Sin HSA $K_D$ (nM) ± E.T.M.
<b>Fab A26-Fv (n=5)</b>	<b>0,145 ± 0,019</b>	<b>0,096 ± 0,017</b>
Fab' A26PEG (n=4)	0,230 ± 0,057	0,322 ± 0,089
Fab' A26 (n=4)	0,068 ± 0,011	0,085 ± 0,031

**Ejemplo 3: Fab A26-Fv modula la producción de citocinas a partir de PBMC expuestos a extracto alérgico de *Dermatophagoides pteronyssinus***

Se aislaron PBMC de voluntarios alérgicos por separación en un gradiente de Ficoll. Los PBMC purificados se expusieron a 25 µg/ml de extracto alérgico de *Dermatophagoides pteronyssinus* en presencia de anticuerpo de ensayo (intervalo de concentración de 50 µg/ml a 0,0005 µg/ml) en un volumen final de 200 µl 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, se recogieron los sobrenadantes y se ensayaron para el contenido de IL-13 por MSD. El gráfico en la figura 10 (a) muestra los datos representativos de 1 donador representativo de 4, donde la media de CE50 para la inhibición de la producción de IL-13 fue 0,87 nM (intervalo de 0,6 nM a 1,07 nM).

Tabla 5: Valores medios de CE<sub>50</sub> para anticuerpos A26 en ensayos *in vitro* de HDM humano

Los valores de CE<sub>50</sub> se calcularon a partir de curvas de inhibición del donador individual por regresión no lineal usando el programa informático Graphpad Prism®

Formato de anticuerpo	Inhibición de producción de IL-13 CE <sub>50</sub> (nM) ± E.T.M.	Inhibición de producción de IL-13 CE <sub>50</sub> (nM) ± E.T.M.
<b>Fab A26-Fv (n=4)</b>	<b>0,865 ± 0,112</b>	<b>0,785 ± 0,216</b>
<b>Fab' A26PEG (n=4)</b>	<b>0,928 ± 0,282</b>	<b>1,310 ± 0,425</b>
<b>Fab' A26 (n=4)</b>	<b>0,335 ± 0,040</b>	<b>0,680 ± 0,223</b>

Fab A26-Fv reduce el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (CD25<sup>+</sup>) activados después reestimulación con antígeno secundario con extracto alérgico de *Dermatophagoides pteronyssinus*

5 Se estimularon linfocitos T CD4<sup>+</sup> de donadores alérgicos *in vitro* durante 7 días con 25 µg/ml de extracto alérgico de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Greer) y APC autólogas, en presencia de nada de anticuerpo o 10 µg/ml de Fab' A26PEG, Fab A26-Fv o Fab' de control (Fab' A33). Las células se lavaron y se dejaron reposar durante 3 días y después se reestimularon con extracto alérgico de *Dermatophagoides pteronyssinus* como previamente (figura 13).  
 10 Después de 3 días, las células se lavaron y se tiñeron con fluorescencia para CD3, CD4 y CD25 superficiales. Las células entonces se analizaron por citometría de flujo en un citómetro de flujo FACS Canto (BD). Las células se seleccionaron en la ventana de adquisición de linfocitos vivos y expresión de CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> antes del análisis. Los datos representan n = 3 donadores incluyendo la media. n.s, Fab A26-Fv en comparación con Fab' de control (significación medida usando prueba de la t bilateral de muestras emparejadas).

15 **Ejemplo 4: Fab A26-Fv inhibe la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en un modelo de ratón de Hu-NSG**

A ratones se les dosificó s.c. 0,03, 0,3, 3 o 30 mg/kg de Fab A26-Fv un día antes de la transferencia de 1 x 10<sup>7</sup> PBMC humanos en la cavidad peritoneal. Después de 14 días, los ratones se exanguinaron por punción cardiaca con anestesia terminal y después se sacrificaron por dislocación cervical. Entonces se determinó el número de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> humanos en la sangre por análisis FACS (figura 10 (b)). Los datos (n=10) se expresan como la media ± ETM y el análisis estadístico es por ANOVA unilateral con ensayo posterior de Bonferroni. Los valores representan el % de inhibición ± ETM. Los resultados se muestran en la figura 14.

25 El modelo de Hu-NSG ha demostrado que Fab A26-Fv inhibe profundamente la proliferación de linfocitos T humanos *in vivo* y apoya el Fab A26-Fv como candidato terapéutico viable para la inhibición de patologías mediadas por linfocitos T. Además, el formato Fab-Fv confirió mayor eficacia a dosis inferiores que el formato Fab' PEG. La disminución en esta respuesta xenoproliferativa de linfocitos T donadores puede proporcionar evidencias de apoyo de que Fab A26-Fv podría ser un agente terapéutico viable para GVHD.

30 **Ejemplo 5: Capacidad de bloqueo de ligando**

La capacidad de Fab A26-dsFv de bloquear la interacción entre OX40 expresado en superficie celular y OX40L recombinante se midió usando un ensayo de bloqueo de ligando basado en citometría de flujo. En resumen, se preincubaron linfocitos T CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> humanos activados con una titulación de Fab A26-Fv. El OX40L recombinante se añadió posteriormente a las células y se dejó que se uniera en presencia de Fab A26-dsFv. Entonces se detectó la proporción de OX40L unido por citometría de flujo usando un reactivo secundario marcado. La figura 11 muestra una curva de inhibición que representa datos combinados de 3 donadores independientes y demuestra que Fab A26-dsFv puede bloquear completamente la unión de OX40L. La media de CI<sub>50</sub> para la inhibición de la unión de OX40L recombinante fue de 0,44 nM (n = 3 donadores).

40 Métodos: Inhibición de la unión de OX40L a linfocitos T CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> humanos activados por Fab A26-Fv

Se aislaron PBMC por separación en un gradiente de Ficoll y se activaron con 4 µg/ml de PHA-L (Sigma) durante 3 días a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, 100 % de humedad. Después se purificaron los linfocitos T CD4<sup>+</sup> del cultivo por selección negativa usando columnas MACS (Miltenyi Biotech, kit de aislamiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> II). Se incubaron 2 x 10<sup>5</sup> linfocitos T CD4<sup>+</sup> en presencia de Fab A26-dsFv (intervalo de concentración final 10 µg/ml - 0,000056 µg/ml (136,6 nM - 0,000765 nM)) durante 30 minutos a 4 °C. Se añadió OX40L (CD252 muCD8 biotinilado, Ancell) a una concentración final de 2 µg/ml y se incubó durante 30 minutos adicionales a 4 °C. Las células se lavaron y se detectó la unión de OX40L por incubación con estreptavidina marcada con PE (Jackson Immunoresearch) antes del análisis por citometría de flujo usando un FACS Canto (Becton Dickinson). Se usó un Fab-dsFv que no se une a OX40 coincidente como control. La curva de inhibición se analizó por regresión no lineal (Graphpad Prism®) para determinar la CI<sub>50</sub>. Se muestra una curva de inhibición que representa los datos combinados de 3 donadores independientes en la figura 11, donde los puntos de datos representan la media y las barras de error representan ETM.

55 La media de CE<sub>50</sub> para la inhibición de la unión de OX40L recombinante a OX40 por Fab A26-Fv fue 0,445 nM. En comparación, Fab' A26PEG fue ligeramente menos potente en bloquear el ligando (CE<sub>50</sub> = 0,739 nM) mientras que Fab' A26 tuvo apenas mayor potencia (CE<sub>50</sub> = 0,242 nM) que el Fab-Fv como se muestra a continuación.

60 Tabla 6: Valores de CE<sub>50</sub> para la inhibición de la unión de OX40L a linfocitos T CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> humanos activados por anticuerpos A26

Formato de anticuerpo	CE <sub>50</sub> de bloqueo de ligando (nM) Media ± E.T.M.
Fab A26-Fv (n = 3)	0,445 ± 0,110
Fab' A26PEG (n = 3)	0,739 ± 0,166
Fab' A26 (n = 3)	0,242 ± 0,069

Los valores de  $CE_{50}$  se calcularon a partir de curvas de inhibición de donadores individuales por regresión no lineal usando el programa informático Graphpad Prism®.

### Ejemplo 6 Efecto de Fab A26-Fv en ensayos *in vitro* funcionales de seres humanos

5 Se evaluó el efecto de Fab A26-Fv sobre las interacciones celulares dependientes de OX40-OX40L en una gama de ensayos de linfocitos humanos dirigidos por antígeno. Estos ensayos se realizaron en presencia de un 5 % de suero humano para asegurar la saturación del sitio de unión de albúmina de la región Fv, predicha que sucedería *in vivo*.

10 Fab A26-Fv inhibe una reacción de linfocitos mixtos

La reacción de linfocitos mixtos (MLR) alogénica unilateral es un modelo *in vitro* de activación y proliferación de linfocitos T alorreactivos (Bach *et al.*, 1964, O'Flaherty *et al.*, 2000). Se activan linfocitos T donadores a través del reconocimiento de antígenos MHC alogénicos en PBMC estimuladores donadores no relacionados, lo que provoca proliferación celular y producción de citocinas (Lukacs *et al.*, 1993). Se ha demostrado que la alorreacción de linfocitos T está dirigida tanto por antígeno MHC alogénico como péptido unido (Sherman *et al.*, 1993). La magnitud de una respuesta MLR se correlaciona con el grado de acoplamiento incorrecto de MHC entre la pareja de respondedor-estimulador (Forrester *et al.*, 2004). Una respuesta MLR provoca la proliferación de células desde el donador que responde y la producción de citocinas derivadas de linfocitos T tanto Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) como Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13). Se cree que el perfil exacto de citocinas en una MLR es específico del emparejamiento de respondedor-estimulador (Jordan *et al.*, 2002). Se han usado ampliamente ensayos de MLR en investigaciones para estudiar las rutas de activación de linfocitos T, cribar fármacos inmunosupresores y predecir posible rechazo de órgano donador en pacientes de trasplante (Bromelow *et al.*, 2001).

25 El efecto de Fab A26-Fv en la activación y proliferación de linfocitos T humanos alorreactivos *in vitro* se investigó usando un ensayo de MLR esencialmente como se describe por O'Flaherty *et al.*, 2000. Se cocultivaron PBMC de dos donadores no relacionados en presencia o ausencia de Fab A26-Fv, Fab' A26 o Fab' A26PEG y la proliferación celular se midió por incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina. Como se muestra en la figura 12, el Fab A26-Fv inhibía la proliferación celular de una manera dependiente de la concentración con un valor de  $CE_{50}$  de 0,56 nM (40,9 ng/ml) y una inhibición máxima de un 55 % ( $n = 3$  emparejamientos de donador). Fab A26-Fv fue ligeramente más potente que Fab' A26PEG, que tuvo un valor de  $CE_{50}$  de 0,88 nM, mientras que Fab' A26 tuvo un valor de  $CE_{50}$  de 0,25 nM como se muestra en la tabla 7.

35 Se aislaron PBMC humanos de dos donadores no relacionados de sangre completa. Las células de un donador se inactivaron por irradiación y para generar la población estimuladora. Las células del donador restante formaron la población respondedora. Las poblaciones estimuladora y respondedora se mezclaron a una relación de 1:1 ( $1 \times 10^5$  células/donador) y se cultivaron en presencia de Fab' A26, Fab A26-Fv o Fab' A26PEG (0,4 ng-25  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 6 días. Se utilizó el reactivo propio Fab-Fv CA162-01297.1 como control coincidente de isotipo. Se midió la proliferación celular en el día 6 por incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina (0,5  $\mu\text{Ci/pocillo}$ ). Los datos se presentan como el porcentaje de inhibición con respecto a la respuesta del que responde más el estimulador en ausencia de reactivo biológico, y son los datos combinados de tres emparejamientos de donador. Los valores de  $CE_{50}$  se calcularon usando el programa informático Graphpad Prism®.

Tabla 7 Valores de  $CE_{50}$  para la inhibición de respuesta proliferativa MLR humana por anticuerpos A26

Formato de anticuerpo	$CE_{50}$ (nM) Media $\pm$ E.T.M.
Fab A26-Fv ( $n = 3$ )	0,56 $\pm$ 0,12
Fab' A26PEG ( $n = 3$ )	0,88 $\pm$ 0,44
Fab' A26 ( $n = 3$ )	0,25 $\pm$ 0,06

45 También se analizaron los sobrenadantes de MLR humana para investigar el efecto de Fab A26-Fv sobre la producción de citocinas. Como se muestra en la figura 12B, Fab A26-Fv inhibía significativamente la producción de IFN- $\gamma$  en la MLR en un promedio de un 81 % ( $n = 3$  emparejamientos de donador).

50 Se aislaron PBMC humanos de dos donadores no relacionados de sangre completa. Las células de un donador se inactivaron por irradiación y para generar la población estimuladora. Las células del donador restante formaron la población respondedora. Las poblaciones estimuladora y respondedora se mezclaron a una relación de 1:1 ( $1 \times 10^5$  células/donador) y se cultivaron en presencia de 25  $\mu\text{g/ml}$  de Fab' A26, Fab A26-Fv o Fab' A26PEG o controles (Fab' A33 o CA162.01297.1) durante 6 días. Se recogieron los sobrenadantes y se ensayaron para el contenido de IFN- $\gamma$  usando un ensayo de MSD. El porcentaje de inhibición se calculó con respecto a células cultivadas sin anticuerpo. Los gráficos representan datos combinados de tres donadores (media  $\pm$  E.T.M.). \*\* =  $p < 0,01$ ; Fab A26-Fv en comparación con Fab-Fv de control (significación medida usando prueba de la t bilateral de muestras emparejadas).

60

**Ejemplo 7 Unión de Fab A26-Fv a linfocitos NK en una MLR humana**

Se investigó el efecto de Fab A26-Fv sobre la división celular de NK en una MLR. La alorreacción de linfocitos T dirige la respuesta de linfocitos mixtos y Fab A26-Fv inhibe profundamente la división de linfocitos T y la producción de IFN $\gamma$  en este sistema. La inhibición de la división de linfocitos NK también podría contribuir a la producción reducida de IFN $\gamma$ . Usando células respondedoras marcadas con CFSE se demostró la inhibición de la división de linfocitos NK por análisis FACS de la población en división (datos no mostrados). Se muestran dos medidas diferentes de división celular. El índice de división representa el número promedio de divisiones celulares que una célula en la población original ha experimentado e incluye las células no divididas; Fab A26-Fv reduce el índice de división, lo que indica que menor células en la población están comprometidas para su división; este efecto está mediado supuestamente por los linfocitos NK que están expresando OX40. El índice de proliferación refleja la proliferación de la población que responde únicamente, y el efecto inhibitor de Fab A26-Fv usando esta medida se reduce relativamente.

**15 Ejemplo 8 Valores medios de  $K_D/CE_{50}$  para Fab A26-Fv en ensayos *in vitro* en seres humanos**

Ensayo de unión/funcional	Media de $K_D/CE_{50}$ (nM) $\pm$ E.T.M.	Media de $K_D/CE_{50}$ ( $\mu$ g/ml)
Afinidad ( $n = 5$ )	0,145 $\pm$ 0,019	0,011
Bloqueo de OX40L ( $n = 3$ )	0,445 $\pm$ 0,110	0,033
Reacción de linfocitos mixtos - Inhibición de proliferación ( $n = 3$ )	0,558 $\pm$ 0,121	0,041
Acaros del polvo doméstico - Inhibición de producción de IL-13 ( $n = 4$ )	0,865 $\pm$ 0,112	0,063

Lista de secuencias

20 <110> UCB Pharma SA

<120> Moléculas de anticuerpo que tienen especificidad por OX40 humano

<130> G0160 WO01

25 <150> US 61/558545

<151> 11-11-2011

30 <160> 28

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

35 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

40 <223> CDRH1

<400> 1

Asn Tyr Gly Ile His

1 5

45 <210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

50 <220>

<223> CDRH2

<400> 2



ES 2 737 998 T3

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

Gly

5 <210> 3  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> CDRH3  
 <400> 3  
 Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr  
 1 5

15 <210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>

20 <223> CDRL1  
 <400> 4  
 Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala Leu Ala  
 1 5 10

25 <210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> CDRL2  
 <400> 5  
 Asn Ala Asn Thr Leu His Thr  
 1 5

35 <210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> CDRL3  
 <400> 6  
 Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu Thr  
 1 5

45 <210> 7  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> Región variable de cadena ligera de anticuerpo A26  
 <400> 7

ES 2 737 998 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala 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

5 <210> 8  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo A26

<400> 8  
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

15 <210> 9  
<211> 214  
<212> PRT

ES 2 737 998 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de componente Fab del anticuerpo anti-OX40

5

<400> 9

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> 10

10

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15

<223> Cadena pesada de componente Fab del anticuerpo anti-OX40

<400> 10

ES 2 737 998 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  
 210 215 220

<210> 11  
 <211> 121  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cadena pesada de componente Fv antialbúmina

10 <400> 11

ES 2 737 998 T3

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

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

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys  
50 55 60

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

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

Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 12  
<211> 112  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Cadena ligera de componente Fv antialbúmina

<400> 12  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn  
20 25 30

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

Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
50 55 60

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

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

Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
100 105 110

15 <210> 13  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial

ES 2 737 998 T3

<220>  
<223> Conector 1

5 <400> 13  
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 14  
<211> 15

10 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Conector 2

15 <400> 14  
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 15  
<211> 357

20 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>

25 <223> Pesada de Fab A26-(G4S,G4T,G4S)-645dsFv(gH5)

<400> 15  
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

ES 2 737 998 T3

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 Ser Gly Gly Gly  
 210 215 220  
 Gly Ser Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu  
 225 230 235 240  
 Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu  
 245 250 255  
 Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp  
 260 265 270  
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp  
 275 280 285

ES 2 737 998 T3

Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr  
 290 295 300

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser  
 305 310 315 320

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro  
 325 330 335

Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 340 345 350

Val Thr Val Ser Ser  
 355

<210> 16  
 <211> 341  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> Ligera de Fab de A26-(3xG4S)-645dsFv(gL4)

<400> 16  
 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



ES 2 737 998 T3

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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 210 215 220

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val  
 225 230 235 240

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro  
 245 250 255

Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
 260 265 270

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val  
 275 280 285

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 290 295 300

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly  
 305 310 315 320

Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val  
 325 330 335

Glu Ile Lys Arg Thr  
 340

<210> 17  
 <211> 119  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Dominio variable de cadena pesada 645 gH1

10 <400> 17

ES 2 737 998 T3

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

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

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met  
65 70 75 80

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

Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 18  
<211> 110  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Dominio variable de cadena ligera 645 gL1

<400> 18  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn  
20 25 30

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

Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys  
50 55 60

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

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

Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

15 <210> 19  
<211> 355  
<212> PRT  
20 <213> Artificial

ES 2 737 998 T3

<220>

<223> Pesada de Fab de A26-(3xG4S)-645dsFv(gH1)

<400> 19

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

5

ES 2 737 998 T3

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 Ser Gly Gly Gly  
 210 215 220

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu  
 225 230 235 240

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu  
 245 250 255

Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp  
 260 265 270

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp  
 275 280 285

Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr  
 290 295 300

Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
 305 310 315 320

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro Gly Tyr  
 325 330 335

Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 340 345 350

Val Ser Ser  
 355

<210> 20  
 <211> 340  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Liger de Fab de A26-(3xG4S)-645dsFv(gLI)

10

<400> 20  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

ES 2 737 998 T3

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 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 210 215 220  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
 225 230 235 240  
 Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser  
 245 250 255  
 Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 260 265 270

ES 2 737 998 T3

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly  
 275 280 285

Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 290 295 300

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly  
 305 310 315 320

Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys  
 325 330 335

Val Glu Ile Lys  
 340

<210> 21  
 <211> 1137  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Cadena pesada de A26-645(gH5) incluyendo líder de OmpA de *E. coli*

10

<400> 21  
 atgaagaaga ctgctatagc gatcgagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60  
 gctgaagttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgctc agcctggagg gagcctgcgt 120  
 ctctcttggtg cagcaagcgg tttcacgttc accaactacg gtatccactg gattcgtcag 180  
 gcaccaggta aaggtctgga atgggtagcc tctatctctc cgtctgggtg tctgacgtac 240  
 taccgtgact ctgtcaaagg tggtttcacc atctctogtg atgacgcgaa aaactctccg 300  
 tacctgcaaa tgaactctct gcgtgcagaa gataccgcag tgtactactg cgctactggt 360  
 ggtgaaggta tcttcgacta ctggggtcag ggtaccctgg taactgtctc gagcgttct 420  
 acaaagggcc caagcgtttt cccactggct ccgtcctcta aatccacctc tgggtgtacg 480  
 gctgcactgg gttgcctggt gaaagactac ttcccagaac cagttaccgt gtcttggaac 540  
 tctggtgcac tgacctctgg tgttcacacc tttccagcag ttctccagtc ttctggtctg 600  
 tactccctgt ctagcgtggt taccgttccg tcttctctc tgggtactca gacctacatc 660  
 tgcaacgtca accacaaacc gtccaacacc aaggtcgaca aaaaagtcga gccgaaatcc 720  
 tgtagtggag gtgggggctc aggtggaggc gggaccggtg gaggtggcag cgaggttcaa 780  
 ctgcttgagt ctggaggagg cctagtcag cctggaggga gcctgcgtct ctcttggtgca 840  
 gtaagcggca tcgacctgag caattacgcc atcaactggg tgagacaagc tccggggaag 900  
 tgtttagaat ggatcgggat aatattggcc agtgggacga ccttttatgc tacatgggag 960  
 aaaggaaggt ttacaattag ccgggacaat agcaaaaaca ccgtgtatct ccaaatgaac 1020  
 tccttgccgag cagaggacac ggccgtgtac tattgtgctc gcaactgtccc aggttatagc 1080  
 actgcaccct acttcgatct gtggggacaa gggaccctgg tgactgtttc aagttaa 1137

15

<210> 22  
 <211> 1074  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

ES 2 737 998 T3

<220>

<223> Cadena pesada de A26-645(gH5)

5 <400> 22  
gaagttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc 60  
tcttgtgcag caagcggttt caggttcacc aactacggta tccactggat tcgtcaggca 120  
ccaggtaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctggtggtct gacgtactac 180  
cgtgactctg tcaaaggctg tttcaccatc tctcgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac 240  
ctgcaaatga actctctgcg tgcagaagat accgcagtgt actactgcgc tactggtggt 300  
gaaggtatct tcgactactg gggtcagggt accctggtaa ctgtctcgag cgcttctaca 360  
aagggcccaa gcgttttccc actggctccg tcctctaaat ccacctctgg tggtagcgtc 420  
gcactggggt gcctggtgaa agactacttc ccagaaccag ttaccgtgtc ttggaactct 480  
gggtgcactga cctctggtgt tcacaccttt ccagcagttc tccagtcttc tggctctgac 540  
tccctgtcta gcgtggttac cgttccgtct tcttctctgg gtactcagac ctacatctgc 600  
aacgtcaacc acaaaccgtc caacaccaag gtcgacaaaa aagtcgagcc gaaatcctgt 660  
agtggagggtg ggggctcagc tggaggcggg accggtggag gtggcagcga ggttcaactg 720  
cttgagtctg gaggaggcct agtccagcct ggaggagcc tgcgtctctc ttgtgcagta 780  
agcggcatcg acctgagcaa ttacgccatc aactgggtga gacaagctcc ggggaagtgt 840  
ttagaatgga tcggtataat atgggccagt gggacgacct tttatgctac atgggcgaaa 900  
ggaaggttta caattagccg ggacaatagc aaaaacaccg tgtatctcca aatgaactcc 960  
ttgcgagcag aggacacggc ggtgtactat tgtgtctgca ctgtcccagg ttatagcact 1020  
gcaccctact tcgatctgtg gggacaaggg accctggtga ctgtttcaag ttaa 1074

<210> 23

<211> 1089

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de A26-645(gL4) incluyendo líder de OmpA de *E. coli*

15 <400> 23  
atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gcgttggtg gtttcgcgac cgttgcgcaa 60

ES 2 737 998 T3

gctgatatcc agatgaccca gagcccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120  
 actattacct gtcgtgcaac ccagagcatc tacaacgctc tggcttggtg tcagcagaaa 180  
 ccgggtaaag cgccaaaact cctgatctac aacgcgaaca ctctgcatac tgggtgtccg 240  
 tctcgtttct ctgcgtctgg ttctggtacg gactctactc tgaccatctc ctctctccag 300  
 ccggaagatt tcgcgaccta ctactgccag cagtactacg attaccact gacgtttggt 360  
 ggtggtacca aagttgagat caaacgtacg gttgcagctc catccgtctt catctttcca 420  
 ccgtctgacg aacagctcaa atctggtact gcttctgctg tttgcctcct gaacaacttc 480  
 tatccgcgtg aagcgaagt ccagtggaaa gtcgacaacg cactccagtc tggtaactct 540  
 caggaatctg tgaccogaaca ggactccaaa gactccacct actctctgtc tagcaccctg 600  
 actctgtcca aagcagacta cgagaaacac aaagtgtacg cttgcgaagt taccatcag 660  
 ggtctgagct ctccggttac caaatccttt aatagagggg agtgtggtgg cgggtgcagt 720  
 ggtggtggag gttccggagg tggcggttca gacatacaaa tgaccagag tccttcatcg 780  
 gtatcccggt ccgttggcga tagggtgact attacatgtc aaagctctcc tagcgtctgg 840  
 agcaattttc tatcctggta tcaacagaaa ccggggaagg ctccaaaact tctgatttat 900  
 gaagcctoga aactcaccag tggagttccg tcaagattca gtggctctgg atcagggaca 960  
 gacttcacgt tgacaatcag ttcgctgcaa ccagaggact ttgcgaccta ctattgtggt 1020  
 ggaggttaca gtagcataag tgatacgaca tttgggtgcg gtactaaggt ggaaatcaaa 1080  
 cgtacctaa 1089

<210> 24  
 <211> 1026  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Cadena ligera de A26-645(gL4)

10

<400> 24  
 gatatccaga tgaccagag cccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 60  
 attacctgtc gtgcaacca gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg 120  
 ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcatactgg tgttccgtct 180  
 cgtttctctg cgtctggttc tggtagcgac tctactotga ccatctctc tctccagccg 240  
 gaagatttctg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttgggtgt 300  
 ggtaccaaaag ttgagatcaa acgtacggtt gcagctccat ccgtcttcat ctttccaccg 360  
 tctgacgaac agctcaaadc tggtagctct tctgtcgttt gcctcctgaa caacttctat 420  
 ccgcgtgaag cgaagtcca gtggaaagtc gacaacgcac tccagtctgg taactctcag 480  
 gaatctgtga ccgaacagga ctccaaagac tccacctact ctctgtctag caccctgact 540



ES 2 737 998 T3

ctgtccaaag cagactacga gaaacacaaa gtgtacgctt gcgaagttac ccatcagggt 600  
ctgagctctc cggttaccaa atcctttaat agaggggagt gtggtggcgg tggcagtgg 660  
ggtggagggt ccggagggtg cggttcagac atacaaatga cccagagtcc ttcacggta 720  
tccgcgtccg ttggcgatag ggtgactatt acatgtcaaa gctctcctag cgtctggagc 780  
aattttctat cctggtatca acagaaaccg ggggaaggctc caaaacttct gatttatgaa 840  
gcctcgaaac tcaccagtgg agttccgtca agattcagtg gctctggatc agggacagac 900  
ttcacgttga caatcagttc gctgcaacca gaggactttg cgacctacta ttgtggtgga 960  
ggttacagta gcataagtga tacgacatth ggggtcggta ctaagggtgga aatcaaaccg 1020  
acctaa 1026

<210> 25  
<211> 1131  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cadena pesada de A26-645(gH5) incluyendo secuencia líder de B72.3

<400> 25  
atggaatggt cctgggtcct cctgtttttc ctttctgtca caaccggggt gcacagcgag 60  
gtgcagctcg tcgagtctgg aggcgggctt gtccagcctg gagggagcct gcgtctctct 120  
tgtgcagcaa gcggtttcac gttcaccaac tacggtatcc actggattcg tcaggcacca 180  
ggtaaaggct tggaatgggt agcctctatc tctccgtctg gtggtctgac gtactaccgt 240  
gactctgtca aaggctgtht caccatctct cgtgatgacg cgaaaaactc tccgtacctg 300  
cagatgaact ctctcgtgc agaagatacc gcagtgtact actgcgctac tgggtggtgaa 360  
ggtatcttcg actactgggg tcagggtacc ctggttaactg tctcaagcgc ttctacaaag 420  
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 480  
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctctg gaactcaggc 540  
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtctctctg actctactcc 600  
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaceta catctgcaac 660  
gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagaaag ttgagcccaa atcttgttcc 720  
ggaggtggcg gttccggagg tggcgggtacc ggtggcgggtg gatccgaagt ccagctgctt 780  
gaatccggag gcggactcgt gcagcccgga ggcagtcttc gcttgcctctg cgctgtatct 840  
ggaatcgacc tgagcaatta cgccatcaac tgggtgagac aggcacctgg gaaatgcctc 900  
gaatggatcg gcattatatg ggctagtggg acgacctttt atgctacatg ggcgaagggt 960  
agattcacia tetcacggga taatagtaag aacacagtgt acctgcagat gaactccctg 1020  
cgagcagagg ataccgccgt ttactattgt gctcgcactg tcccaggtta tagcactgca 1080  
ccctactttg atctgtgggg gcagggcact ctggtcaccg tctcagattg a 1131

<210> 26  
<211> 1074  
<212> ADN  
<213> Artificial

ES 2 737 998 T3

<220>

<223> Cadena pesada de A26-645(gH5)

<400> 26

	gaggtgcagc tcgtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc	60
	tcttgtgcag caagcggttt cacgttcacc aactacggta tccactggat tcgtcaggca	120
	ccaggtaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctggtggtct gacgtactac	180
	cgtgactctg tcaaaggtcg tttcaccatc tctcgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac	240
	ctgcagatga actctctgcg tgcagaagat accgcagtgt actactgcgc tactggtggt	300
	gaaggtatct tcgactactg gggtcagggt accctggtaa ctgtctcaag cgcttctaca	360
	aagggcccat cgtctttccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg	420
	gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca	480
	ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc tggactctac	540
	tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc	600
	aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt	660
	tccggaggtg gcggttccgg aggtggcggg accggtggcg gtggatccga agtccagctg	720
	cttgaatccg gaggcggact cgtgcagccc ggaggcagtc ttcgcttgtc ctgcgctgta	780
	tctggaatcg acctgagcaa ttacgccatc aactgggtga gacaggcacc tgggaaatgc	840
	ctcgaatgga tcggcattat atgggctagt gggacgacct tttatgctac atgggcgaag	900
	ggtagattca caatctcacg ggataatagt aagaacacag tgtacctgca gatgaactcc	960
	ctgcgagcag aggataccgc cgtttactat tgtgctcgca ctgtcccagg ttatagcaact	1020
5	gcaccctact ttgatctgtg ggggcagggc actctggtca ccgtctcgag ttga	1074

<210> 27

<211> 1086

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de A26-645(gL4) incluyendo secuencia líder de B72.3

15 <400> 27

	atgtcagttc ccacacaggt gctgggcctg cttctgttgt ggctcaccga tgctaggtgt	60
	gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact	120

ES 2 737 998 T3

attacctgtc gtgcaaccca gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg 180  
 ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataaccg tgttccgtct 240  
 cgtttctctg cgtctggttc tggtagcgac tctactctga ccatctcctc tctgcagccg 300  
 gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttgggtgt 360  
 ggtaccaaag ttgagatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccccca 420  
 tctgatgagc agttgaagtc tggcactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctac 480  
 cctagagagg ccaaagtcca gtggaagggtg gataacgccc ttcaatccgg aaactcccag 540  
 gagagtgtca ctgagcagga ctcaaaggac tccacctata gccttagcag cacactgaca 600  
 ctgagcaagg ctgactacga gaaacacaag gtctacgcct gcgaagtgac acatcaaggc 660  
 ctgagctcac ccgtgacaaa gagctttaac aggggagagt gtggtggagg tggtctggtc 720  
 ggtggtggct ccggaggcgg aggaagcgac atccagatga cccagagccc ttctctgta 780  
 agcggcagtg tcggagacag agtgactatt acctgccaaa gctccccttc agtctggtcc 840  
 aattttctat cctggtacca gcaaaagccc ggaaaggctc ctaaattgct gatctacgaa 900  
 gcaagcaaac tcaccagcgg cgtgccccagc aggttcagcg gcagtgggtc tggaaactgac 960  
 tttaccctga caatctcctc actccagccc gaggacttctg ccacctatta ctgcggtgga 1020  
 ggttacagta gcataagtga tacgacattt ggatgcccga ctaaagtgga aatcaagcgt 1080  
 acctga 1086

<210> 28  
 <211> 1026  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Cadena ligera de A26-645(gL4)

10

<400> 28  
 gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggoga tcgtgtgact 60  
 attacctgtc gtgcaaccca gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg 120  
 ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataaccg tgttccgtct 180  
 cgtttctctg cgtctggttc tggtagcgac tctactctga ccatctcctc tctgcagccg 240  
 gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttgggtgt 300  
 ggtaccaaag ttgagatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccccca 360  
 tctgatgagc agttgaagtc tggcactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctac 420  
 cctagagagg ccaaagtcca gtggaagggtg gataacgccc ttcaatccgg aaactcccag 480  
 gagagtgtca ctgagcagga ctcaaaggac tccacctata gccttagcag cacactgaca 540

# ES 2 737 998 T3

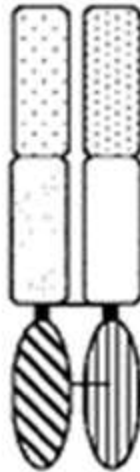
ctgagcaagg ctgactacga gaaacacaag gtctacgcct gcgaagtgac acatcaaggc	600
ctgagctcac ccgtgacaaa gagctttaac aggggagagt gtggtggagg tggctctggc	660
ggtggtggct ccggaggcgg aggaagcgac atccagatga cccagagccc ttctctgta	720
agcgccagtg tcggagacag agtgactatt acctgccaaa gctccccttc agtctggtcc	780
aattttctat cctggtacca gcaaaagccc ggaaaggctc ctaaattgct gatctacgaa	840
gcaagcaaac tcaccagcgg cgtgccacgc aggttcagcg gcagtgggtc tggactgac	900
tttaccctga caatctctc actccagccc gaggacttcg ccacctatta ctgcggtgga	960
ggttacagta gcataagtga tacgacatth ggatgcggca ctaaagtgga aatcaagcgt	1020
acctga	1026

**REIVINDICACIONES**


1. Una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico que se une a OX40 humano y seroalbúmina humana, y antagoniza la unión de OX40 a OX40L, comprendiendo la proteína de fusión de anticuerpo biespecífico:
- 5 una cadena pesada que comprende, en secuencia desde el extremo N, un primer dominio variable de cadena pesada (V<sub>H1</sub>), un dominio CH1 y un segundo dominio variable de cadena pesada (V<sub>H2</sub>), una cadena ligera que comprende, en secuencia desde el extremo N, un primer dominio variable de cadena ligera (V<sub>L1</sub>), un dominio CL y un segundo dominio variable de cadena ligera (V<sub>L2</sub>),
- 10 en la que dicha cadena pesada y ligera se alinean de modo que V<sub>H1</sub> y V<sub>L1</sub> forman un primer sitio de unión a antígeno y V<sub>H2</sub> y V<sub>L2</sub> forman un segundo sitio de unión a antígeno, en la que el antígeno unido por el primer sitio de unión a antígeno es OX40 humano y el antígeno unido por el segundo sitio de unión a antígeno es seroalbúmina humana,
- 15 en la que el primer dominio variable de la cadena pesada (V<sub>H1</sub>) 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 y el primer dominio variable de la cadena ligera (V<sub>L1</sub>) 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,
- 20 en la que el segundo dominio variable de cadena pesada (V<sub>H2</sub>) tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 11 y el segundo dominio variable de cadena ligera (V<sub>L2</sub>) tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 12 y el segundo dominio variable de cadena pesada (V<sub>H2</sub>) y el segundo dominio variable de cadena ligera (V<sub>L2</sub>) están unidos por un enlace disulfuro.
2. Una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, en que hay un conector peptídico entre el dominio CH1 y el segundo dominio variable de cadena pesada (V<sub>H2</sub>).
- 25 3. Una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en que hay un conector peptídico entre el dominio CL y el segundo dominio variable de cadena ligera (V<sub>L2</sub>).
- 30 4. Una proteína de fusión de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el primer dominio variable de cadena pesada (V<sub>H1</sub>) comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 8.
5. Una proteína de fusión de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el primer dominio variable de cadena ligera (V<sub>L1</sub>) comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7.
- 35 6. Una proteína de fusión de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la cadena pesada comprende o consiste en la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15.
7. Una proteína de fusión de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la cadena ligera comprende o consiste en la secuencia dada en la SEQ ID NO: 16.
- 40 8. Una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico que se une a OX40 humano y seroalbúmina humana, y antagoniza la unión de OX40 a OX40L, en la que la proteína de fusión de anticuerpo biespecífico 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: 16.
- 45 9. Una secuencia de ADN aislada que codifica una proteína de fusión de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 50 10. Un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN de acuerdo con la reivindicación 9.
11. Un vector de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el vector comprende las secuencias dadas en la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 24.
- 55 12. Una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de clonación o expresión de acuerdo con la reivindicación 10 o reivindicación 11.
13. Un proceso para la producción de la proteína de fusión de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 12 y aislar la proteína de fusión de anticuerpo.
- 60 14. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 65



15. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende adicionalmente otros ingredientes activos.
- 5 16. Una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14 o reivindicación 15, para su uso en tratamiento.
- 10 17. Una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14 o reivindicación 15, para su uso en el tratamiento o profilaxis de un trastorno patológico que se selecciona del grupo que consiste en alergia, EPOC, enfermedad autoinmunitaria, artritis reumatoide, asma, enfermedad de injerto contra hospedador, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, lupus eritematoso diseminado, nefritis lúpica, miastenia grave, enfermedad de Graves, rechazo de trasplante, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schonlein, esclerosis diseminada e inflamación pulmonar inducida por virus.
- 15 18. La proteína de fusión de anticuerpo biespecífico o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en la que el trastorno patológico es enfermedad de injerto contra hospedador.
- 20 19. La proteína de fusión de anticuerpo biespecífico o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en la que el trastorno patológico es lupus eritematoso diseminado.


Figura 1




Primera región variable de la cadena ligera VL1 

Primera región variable de la cadena pesada VH1 

Regiones constantes cKappa  y CH1 

Segunda región variable de la cadena ligera VL2 

Segunda región variable de la cadena pesada VH2 

Enlace disulfuro 

Figura 2

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRF  
SASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKR

(b) Región variable de cadena pesada del anticuerpo A26 (SEQ ID NO: 8)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYIRD  
SVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLVTVSS

(c)

CDRH1: NYGIH (SEQ ID NO: 1)

CDRH2: SISPSGGLTYIRDSVKG (SEQ ID NO: 2)

CDRH3: GGEGIFDY (SEQ ID NO: 3)

CDRL1: RATQSIYNALA (SEQ ID NO: 4)

CDRL2: NANTLHT (SEQ ID NO: 5)

CDRL3: QQYYDYPLT (SEQ ID NO: 6)

(d) Cadena ligera de componente Fab del anticuerpo antiOX40 (SEQ ID NO: 9)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRF  
SASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ  
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADY  
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(d) Cadena ligera de componente Fab del anticuerpo antiOX40 (SEQ ID NO: 10)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYIRD  
SVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLVTVSSASTKGPS  
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC



Figura 3

(d) Cadena pesada de componente Fv antialbúmina (SEQ ID NO: 11)

EVQLLES<sup>GGGLVQPGGSLRL</sup>SCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDNK  
NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSS

(b) Cadena ligera de componente Fv antialbúmina (SEQ ID NO: 12)

DIQMTQSPSSVSASVGD<sup>RVITITCQSSPSVWSN</sup>FLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTS<sup>GVPSRFS</sup>SGSGSGTD<sup>FTLT</sup>  
ISSLQPEDFATYYCGGGYSSISD<sup>TFGCGTKVEIKRT</sup>

(c) Conector 1 (SEQ ID NO: 13)

SGGGSGGGGTGGGGS

(d) Conector 2 (SEQ ID NO: 14)

GGGGSGGGSGGGGS

(e) Pesada de Fab A26 (G4S, G4T, G4S)-645dsFv(gH5) (SEQ ID NO: 15)

EVQLVES<sup>GGGLVQPGGSLRL</sup>SCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASIS<sup>PSGG</sup>LTYYRDSVKGRFTISR<sup>DDA</sup>  
KNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFP<sup>LAPSSKST</sup>SGGTAALGCLVKDYF  
PEPVTVSWNSGALTS<sup>GVHTFFAVLQSSGLYSLSSV</sup>TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK<sup>KVEPKSC</sup>SGGGG  
SGGGGTGGGGSEVQLLES<sup>GGGLVQPGGSLRL</sup>SCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAK  
GRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSS

(f) Ligera de Fab A26 (3xG4S)-645dsFv(gL4) (SEQ ID NO: 16)

DIQMTQSPSSLSASVGD<sup>RVITITCRATQSIYNALAWY</sup>QQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGTD<sup>STLTI</sup>  
SSLQPEDFATYYCQYYDYPLTFGGG<sup>TKVEIKRTVAAPS</sup>VFI<sup>FPPS</sup>DEQLKSGTASV<sup>VCLLNNFY</sup>PREAKVQ<sup>WKV</sup>  
DNALQSGNSQESVTEQDSK<sup>DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV</sup>TKSFNRGECGGGGSGGGGSG  
GGGSDIQMTQSPSSVSASVGD<sup>RVITITCQSSPSVWSN</sup>FLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTS<sup>GVPSRFS</sup>SGSGSGTD  
FTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISD<sup>TFGCGTKVEIKRT</sup>

Figura 4

(a) Dominio variable de cadena pesada 645gH1 (SEQ ID NO: 17)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRSTT  
VYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLVTVSS

(b) Dominio variable de cadena ligera 645gL1 (SEQ ID NO: 18)

DIVMTQSPSSVSASVGDRTVITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFRKGGSGTDFTLT  
ISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDITFGCGTKVEIK

(c) Pesada de Fab A26 (3xG4S)-645dsFv(gH1) (SEQ ID NO: 19)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYYRDSVKGRFTISRDDA  
KNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF  
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCSGGGG  
SGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAK  
GRFTISRSTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLVTVSS

(c) Ligera de Fab A26 (3xG4S)-645dsFv(gL1) (SEQ ID NO: 20)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGTDSTLT  
SSLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV  
DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSSGGGSGGGGS  
GGGGSDIVMTQSPSSVSASVGDRTVITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFRKGGSGT  
DFTLTSSLQPEDFATYYCGGGYSSISDITFGCGTKVEIK

Figura 5

a) ADN que codifica la cadena pesada de A26-645(gH5) incluyendo el líder de OmpA de *E. coli* (SEQ ID NO: 21)

ATGAAGAAGACTGCTATAGCGATCGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTTCGCCACCGTGGCGCAAGCTGAAGTTCAGCTG  
 GTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTCC  
 ACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTCAGGCACCAGGTAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCT  
 GGTGGTCTGACGTACTACCGTGACTCTGTCAAAGGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCG  
 TACCTGCAAATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTC  
 GACTACTGGGGTCAAGGTACCCCTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACAAAGGGCCCAAGCGTTTTCCCACTGGCT  
 CCGTCCTCTAAATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACCTGGGTTGCCTGGTGAAGACTACTTCCCAGAACCAGTT  
 ACCGTGTCTTGAACTCTGGTGCACCTGACCTCTGGTGTTCACACCTTTCCAGCAGTTCTCCAGTCTTCTGGTCTG  
 TACTCCCTGTCTAGCGTGGTTACCGTTCCTCTCTCTGGTACTCAGACCTACATCTGCAACGTCAACCAC  
 AAACCGTCCAACACCAAGGTGCACAAAAAAGTCGAGCCGAAATCCTGTAGTGGAGGTGGGGGCTCAGGTGGAGGC  
 GGGACCGGTGGAGGTGGCAGCGAGGTTCAACTGCTTGAGTCTGGAGGAGGCCCTAGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTG  
 CGTCTCTCTTGTGCAGTAAGCGGCATCGACCTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAAGCTCCGGGGAAG  
 TGTTTLAGAATGGATCGGTATAATATGGGCCAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGCGAAAGGAAGGTTTACA  
 ATTAGCCGGGACAATAGCAAAAACACCGTGTATCTCCAATGAACTCCTTGCAGCAGAGGACACGGCGGTGTAC  
 TATTGTGCTCGCACTGTCCCAGGTTATAGCACTGCACCCTACTTCGATCTGTGGGGACAAGGGACCCCTGGTACT  
 GTTTCAAGTTAA

b) ADN que codifica la cadena pesada de A26-645(gH5) (SEQ ID NO: 22)

GAAGTTCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGCAAGC  
 GGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTCAGGCACCAGGTAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCT  
 ATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTACTACCGTGACTCTGTCAAAGGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATGACGCG  
 AAAAATCTCCGTACCTGCAAATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGT  
 GAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAAGGTACCCCTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACAAAGGGCCCAAGCGTT  
 TCCCCTACTGGCTCCGTCCTCTAAATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACCTGGGTTGCCTGGTGAAGACTACTTC  
 CCAGAACCAGTTACCGTGTCTTGAACTCTGGTGCACCTGACCTCTGGTGTTCACACCTTTCCAGCAGTTCTCCAG  
 TCTTCTGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGTTACCGTTCCTCTCTCTGGTACTCAGACCTACATCTGC  
 AACGTCAACCACAAACCGTCCAACACCAAGGTGCACAAAAAAGTCGAGCCGAAATCCTGTAGTGGAGGTGGGGG  
 TCAGGTGGAGGCGGGACCGGTGGAGGTPGCAGCGAGGTTCAACTGCTTGAGTCTGGAGGAGGCCCTAGTCCAGCCT  
 GGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGTAAGCGGCATCGACCTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAA  
 GCTCCGGGGAAGTGTTTLAGAATGGATCGGTATAATATGGGCCAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAA  
 GGAAGGTTTACAATTAGCCGGGACAATAGCAAAAACACCGTGTATCTCCAATGAACTCCTTGCAGCAGAGGAC  
 ACGGCGGTGTACTATTGTGCTCGCACTGTCCCAGGTTATAGCACTGCACCCTACTTCGATCTGTGGGGACAAGGG  
 ACCCTGGTACTGTTTCAAGTTAA

## Figura 6

a) ADN que codifica la cadena ligera de A26-645(gL4) incluyendo el líder de OmpA de *E. coli* (SEQ ID NO: 23)

ATGAAAAAGACAGCTATCGCAATTGCAGTGGCGTTGGCTGGTTTTCGCGACCGTTGCGCAAGCTGATATCCAGATG  
 ACCCAGAGCCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTCGTGCAACCCAGAGCATC  
 TACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAACGCGAACACTCTG  
 CATACTGGTGTTCGCTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTCCAG  
 CCGGAAGATTTGCGGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTT  
 GAGATCAAACGTACGGTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTCCACCGTCTGACGAACAGCTCAAATCTGGTACT  
 GCTTCTGTGCTTTGCCTCCTGAACAACCTCTATCCGCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAAGTCGACAACGCCTC  
 CAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCTCTGTCTAGCACCCCTG  
 ACTCTGTCCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTGTACGCTTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGAGCTCTCCG  
 GTTACCAAATCCTTTAATAGAGGGGAGTGTGGTGGCGGTGGCAGTGGTGGTGGAGGTTCCGGAGGTGGCGGTTCA  
 GACATACAAATGACCCAGAGTCCCTTCATCGGTATCCGCGTCCGTTGGCGATAGGGTGACTATTACATGTCAAAGC  
 TCTCCTAGCGTCTGGAGCAATTTTCTATCCTGGTATCAACAGAAACCGGGGAAGGCTCCAAAACCTCTGATTTAT  
 GAAGCCTCGAAACTCACCAGTGGAGTTCGCTCAAGATTCAGTGGCTCTGGATCAGGGACAGACTTCACGTTGACA  
 ATCAGTTCGCTGCAACCAGAGGACTTTGCGACCTACTATTGTGGTGGAGGTTACAGTAGCATAAGTGATACGACA  
 TTTGGGTGCGGTACTAAGGTGGAAATCAAACGTACCTAA

b) ADN que codifica la cadena ligera de A26-645(gL4) (SEQ ID NO: 24)

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTCGTGCA  
 ACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAAC  
 GCGAACACTCTGCATACTGGTGTTCGCTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATC  
 TCCTCTCTCCAGCCGGAAGATTTGCGGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGT  
 GGTACCAAAGTTGAGATCAAACGTACGGTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTCCACCGTCTGACGAACAGCTC  
 AAATCTGGTACTGCTTCTGTGCTTTGCCTCCTGAACAACCTCTATCCGCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAAGTC  
 GACAACGCCTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCTCTG  
 TCTAGCACCCCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTGTACGCTTGCGAAGTTACCCATCAGGGT  
 CTGAGCTCTCCGTTACCAAATCCTTTAATAGAGGGGAGTGTGGTGGCGGTGGCAGTGGTGGTGGAGGTTCCGGA  
 GGTGGCGGTTACAGACATACAAATGACCCAGAGTCCCTTCATCGGTATCCGCGTCCGTTGGCGATAGGGTGACTATT  
 ACATGTCAAAGCTCTCCTAGCGTCTGGAGCAATTTTCTATCCTGGTATCAACAGAAACCGGGGAAGGCTCCAAA  
 CTTCTGATTTATGAAGCCTCGAAACTCACCAGTGGAGTTCGCTCAAGATTCAGTGGCTCTGGATCAGGGACAGAC  
 TTCAGTTGACAATCAGTTCGCTGCAACCAGAGGACTTTGCGACCTACTATTGTGGTGGAGGTTACAGTAGCATA  
 AGTGATACGACATTTGGGTGCGGTACTAAGGTGGAAATCAAACGTACCTAA

Figura 7

a) ADN que codifica la cadena pesada de A26-645(gH5) incluyendo la secuencia líder de B72.3 (SEQ ID NO: 25)

ATGGAATGGTCCTGGGTCTTCTGTTTTTCCTTTCTGTCAACAACCGGGGTGCACAGCGAGGTGCAGCTCGTCGAG  
 TCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGCAAGCGGTTTCAGGTTACCAAC  
 TACGGTATCCACTGGATTTCGTCAGGCACCAGGTAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCCTGGTGGT  
 CTGACGTACTACCGTGACTCTGTCAAAGGTCGTTTACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCGTACCTG  
 CAGATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTAC  
 TGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCAAGCGCTTCTACAAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCC  
 TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG  
 TCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTGGACTCTACTCC  
 CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC  
 AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTTCGGAGGTGGCGGTTCGGAGGTGGCGGTACC  
 GGTGGCGGTGGATCCGAAGTCCAGCTGCTTGAATCCGGAGGCGGACTCGTGCAGCCCAGGAGGCAGTCTTCGCTTG  
 TCCTGCGCTGTATCTGGAATCGACCTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAGGCACCTGGGAAATGCCTC  
 GAATGGATCGGCATTATATGGGCTAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAGGGTAGATTACAAATCTCA  
 CGGGATAATAGTAAGAACACAGTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGAGCAGAGGATACCGCCGTTTACTATTGT  
 GCTCGCACTGTCCAGGTTATAGCACTGCACCCTACTTTGATCTGTGGGGGCAGGGCACTCTGGTCACCGTCTCG  
 AGTTGA

b) ADN que codifica la cadena pesada de A26-645 (gH5) (SEQ ID NO: 26)

GAGGTGCAGCTCGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGCAAGC  
 GGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTCAGGCACCAGGTAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCT  
 ATCTCTCCGTCCTGGTGGTCTGACGTACTACCGTGACTCTGTCAAAGGTCGTTTACCATCTCTCGTGATGACGCG  
 AAAAATCTCCGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGT  
 GAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCAAGCGCTTCTACAAAGGGCCCATCGGTC  
 TCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC  
 CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAG  
 TCCTCTGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC  
 AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTTCGGAGGTGGCGGT  
 TCCGGAGGTGGCGGTACCGGTGGCGGTGGATCCGAAGTCCAGCTGCTTGAATCCGGAGGCGGACTCGTGCAGCCC  
 GGAGGCAGTCTTCGCTTGTCTGCGCTGTATCTGGAATCGACCTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAG  
 GCACCTGGGAAATGCCTCGAATGGATCGGCATTATATGGGCTAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAG  
 GGTAGATTACAAATCTCACGGGATAATAGTAAGAACACAGTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGAGCAGAGGAT  
 ACCGCCGTTTACTATTGTGCTCGCACTGTCCAGGTTATAGCACTGCACCCTACTTTGATCTGTGGGGGCAGGGC  
 ACTCTGGTCACCGTCTCGAGTTGA

Figura 8

a) ADN que codifica la cadena ligera de A26-645(gL4) incluyendo la secuencia líder de B72.3 (SEQ ID NO: 27)

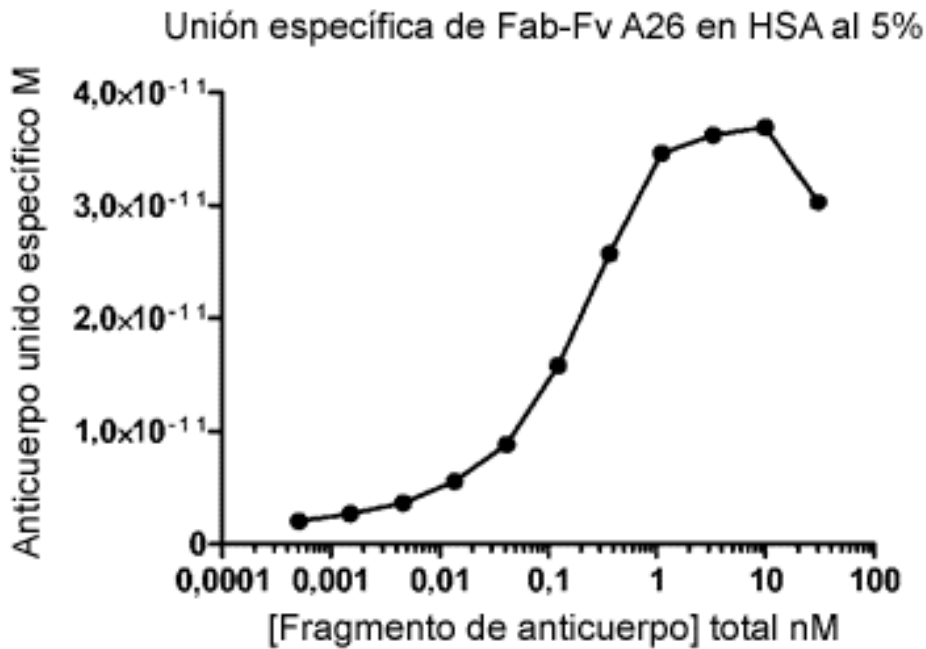
ATGTCAGTTCCCACACAGGTGCTGGGCCTGCTTCTGTTGTGGCTCACCGATGCTAGGTGTGATATCCAGATGACC  
 CAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGGGATCGTGTGACTATTACCTGTCGTGCAAOCCAGAGCATCTAC  
 AACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCAT  
 ACCGGTGTTCGGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCG  
 GAAGATTTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAG  
 ATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCCCATCTGATGAGCAGTTGAAGTCTGGCACTGCC  
 TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCTAGAGAGGCCAAAGTCCAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTTCAA  
 TCCGGAAACTCCCAGGAGAGTGTCACTGAGCAGGACTCAAAGGACTCCACCTATAGCCTTAGCAGCACACTGACA  
 CTGAGCAAGGCTGACTACGAGAAACACAAGGTCTACGCCTGCGAAGTGACACATCAAGGCCTGAGCTCACCCGTG  
 ACAAGAGCTTTAACAGGGGAGAGTGTGGTGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGTGGCTCCGGAGGCGGAGGAAGCGAC  
 ATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCTCTGTAAGCGCCAGTGTGCGAGACAGAGTGACTATTACCTGCCAAAGCTCC  
 CCTTCAGTCTGGTCCAATTTTCTATCCTGGTACCAGCAAAAGCCCGGAAAGGCTCCTAAATTGCTGATCTACGAA  
 GCAAGCAAACCTACCAGCGGCGTCCCAGCAGGTTTCAGCGGCAGTGGGTCTGGAAGTACTTTACCCTGACAATC  
 TCCTCACTCCAGCCCAGGACTTCGCCACCTATTACTGCGGTGGAGGTTACAGTAGCATAAGTGATACGACATTT  
 GGATGCGGCACTAAAGTGGAAATCAAGCGTACCTGA

b) ADN que codifica la cadena ligera de A26-645(gL4) (SEQ ID NO: 28)

GATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGGGATCGTGTGACTATTACCTGTCGTGCA  
 ACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCCTGATCTACAAC  
 GCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCCTGTTTCTCTGCGTCTGGTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATC  
 TCCTCTCTGCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGT  
 GGTACCAAAGTTGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCCCATCTGATGAGCAGTTG  
 AAGTCTGGCACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCTAGAGAGGCCAAAGTCCAGTGGAAGGTG  
 GATAACGCCCTTCAATCCGGAAACTCCCAGGAGAGTGTCACTGAGCAGGACTCAAAGGACTCCACCTATAGCCTT  
 AGCAGCACACTGACACTGAGCAAGGCTGACTACGAGAAACACAAGGTCTACGCCTGCGAAGTGACACATCAAGGC  
 CTGAGCTCACCCGTGACAAAGAGCTTTAACAGGGGAGAGTGTGGTGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGTGGCTCCGGA  
 GGCGGAGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCTCTGTAAGCGCCAGTGTGCGAGACAGAGTGACTATT  
 ACCTGCCAAAGCTCCCCTTCAGTCTGGTCCAATTTTCTATCCTGGTACCAGCAAAAGCCCGGAAAGGCTCCTAAA  
 TTGCTGATCTACGAAGCAAGCAAACCTACCAGCGGCGTCCCAGCAGGTTTCAGCGGCAGTGGGTCTGGAAGTACT  
 TTTACCCCTGACAATCTCCTCACTCCAGCCCAGGACTTCGCCACCTATTACTGCGGTGGAGGTTACAGTAGCATA  
 AGTGATACGACATTTGGATGCGGCACTAAAGTGGAAATCAAGCGTACCTGA

Figura 9

**A**



**B**

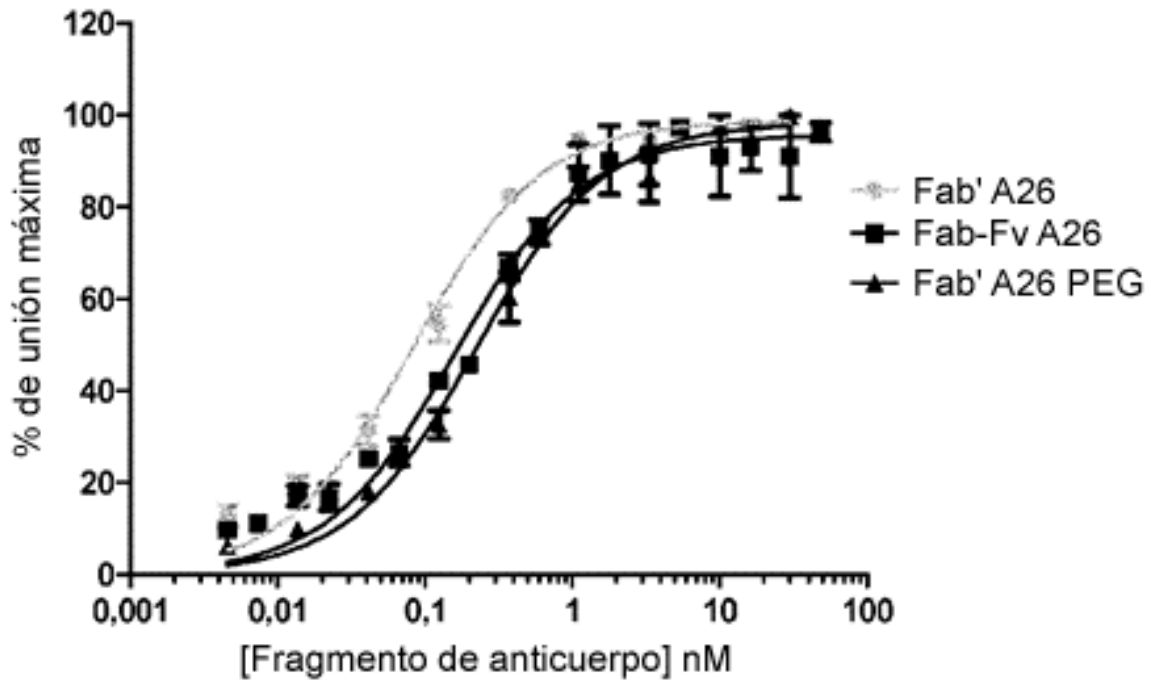
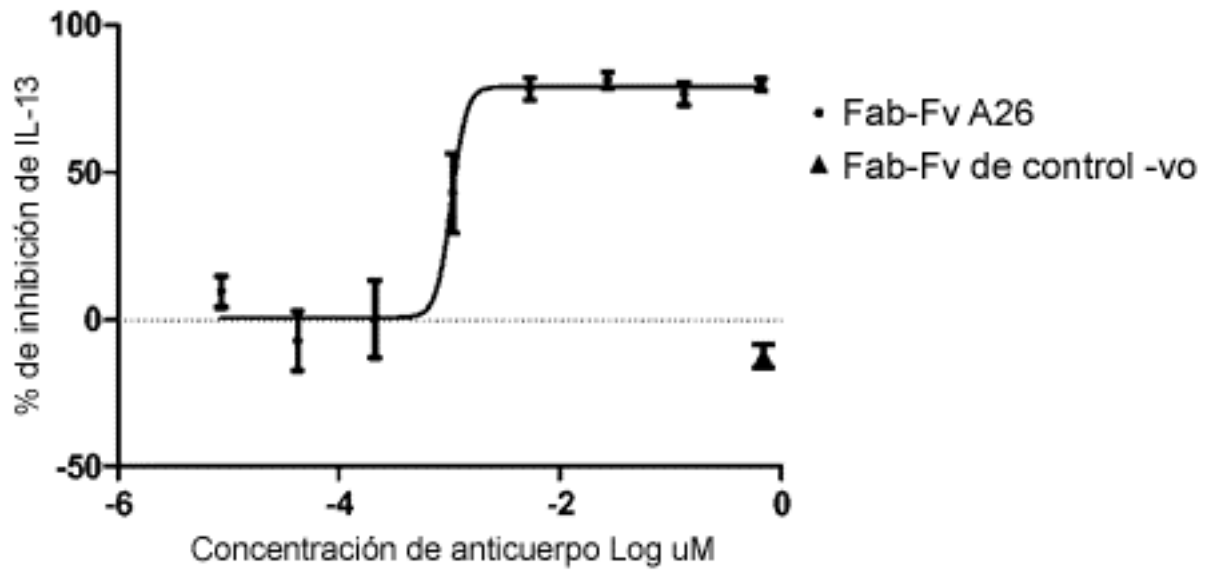


Figura 10

(a)



(b)

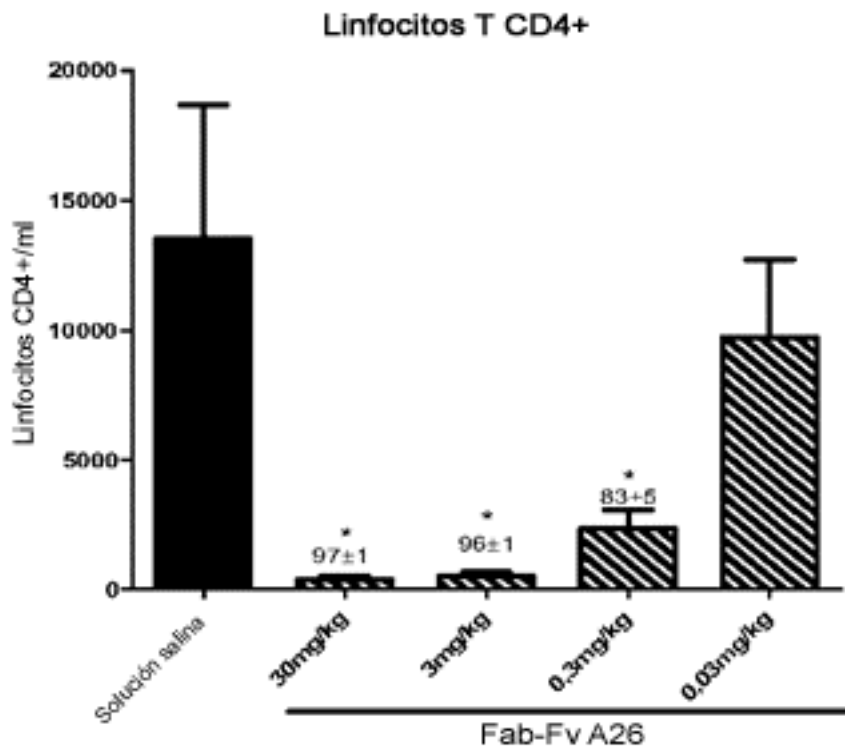
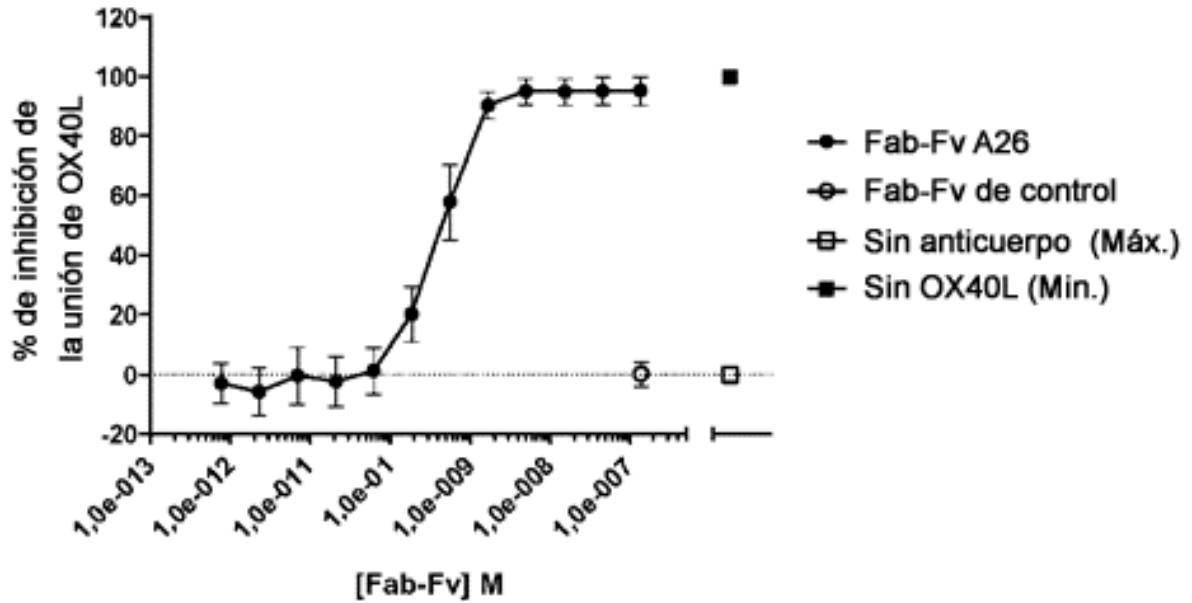




Figura 11

**A**

Inhibición de la unión de OX40L a linfocitos T CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> humanos activados por Fab-Fv A26



**B**

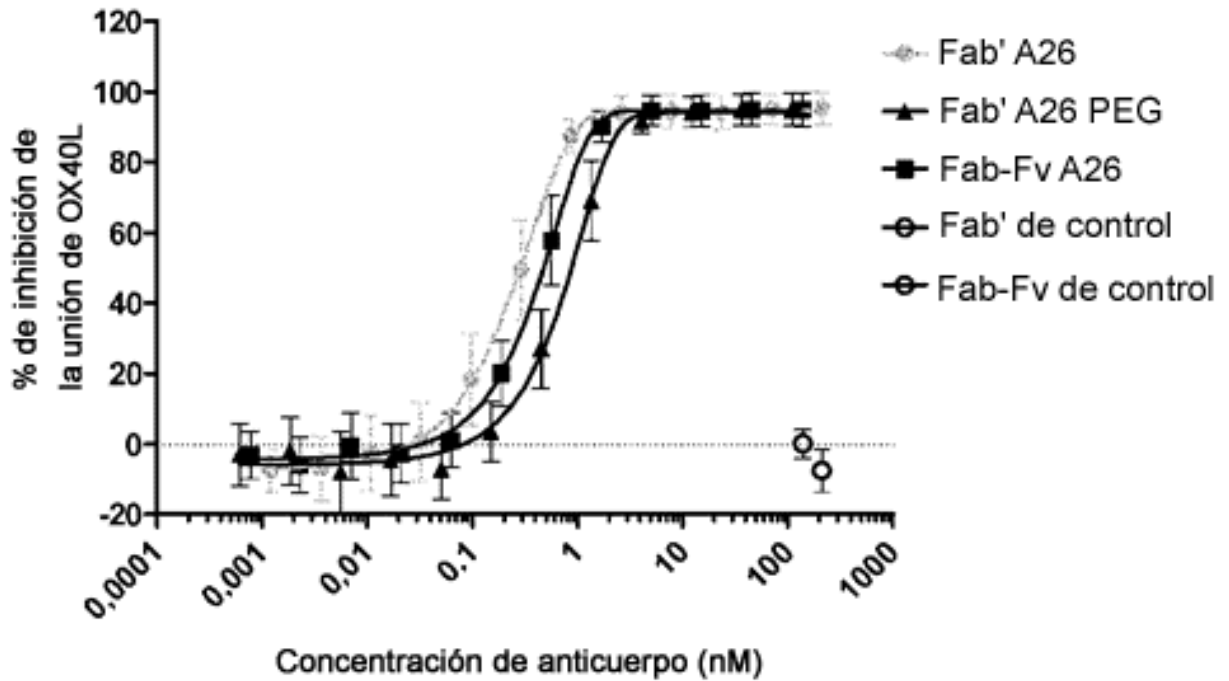
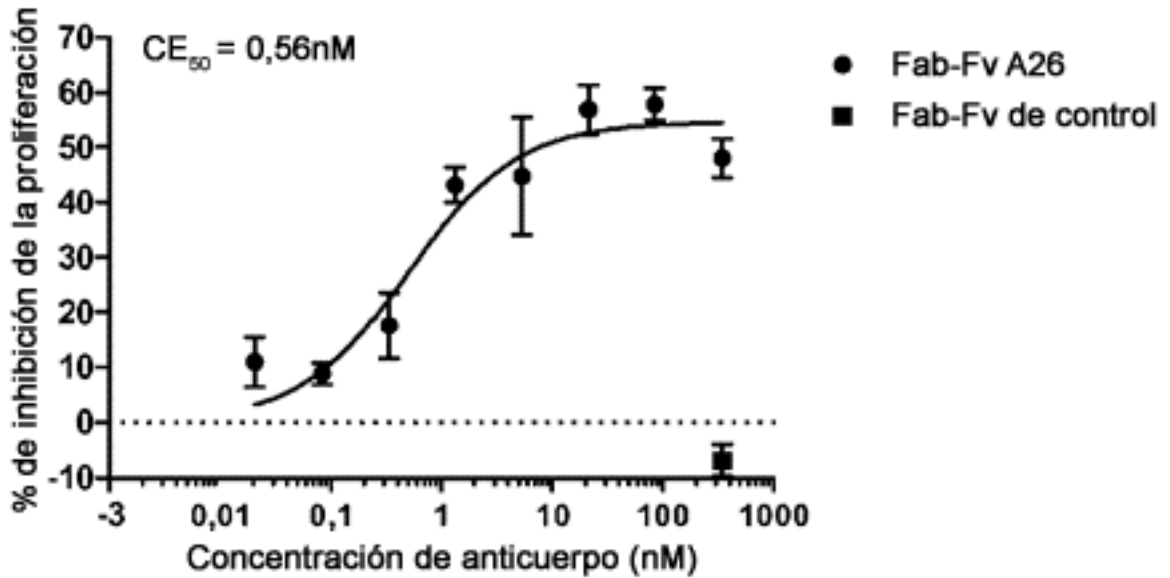


Figura 12

**A** Fab-Fv A26 inhibe una reacción de linfocitos mixtos humanos



**B** Fab-Fv A26 inhibe la producción de IFN- $\gamma$  durante una MLR humana

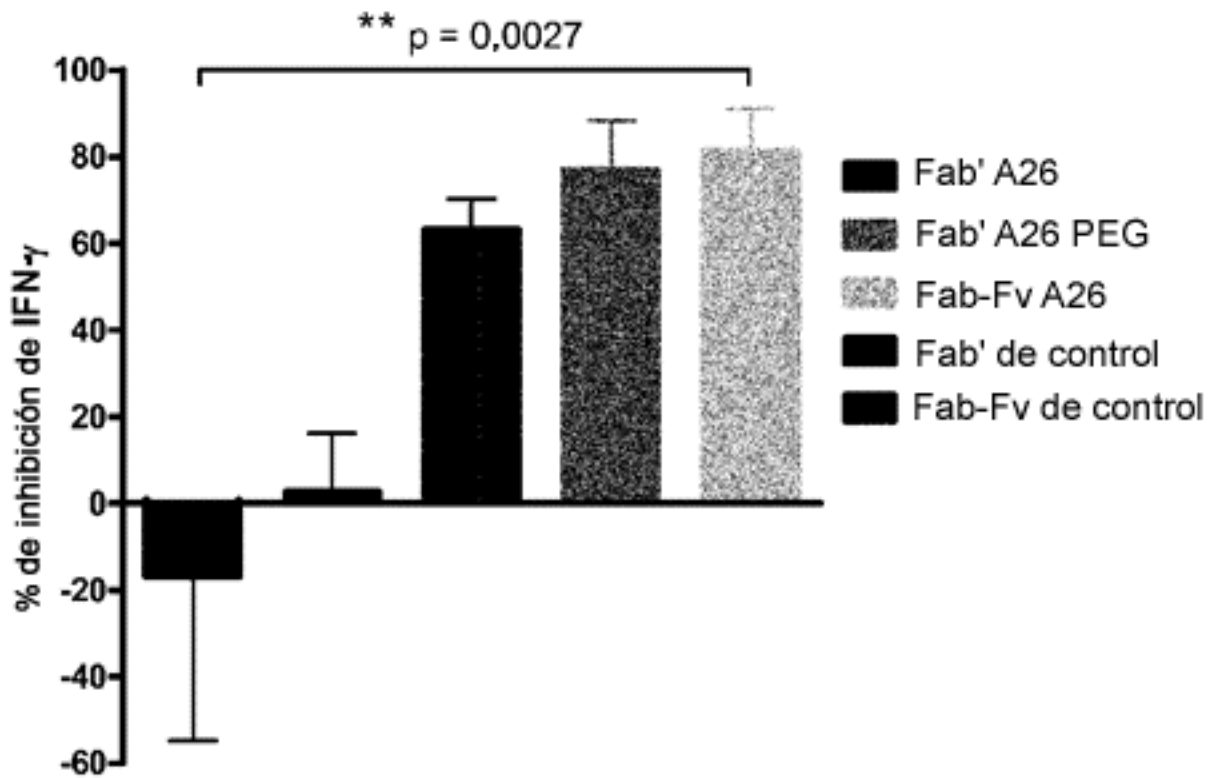


Figura 13

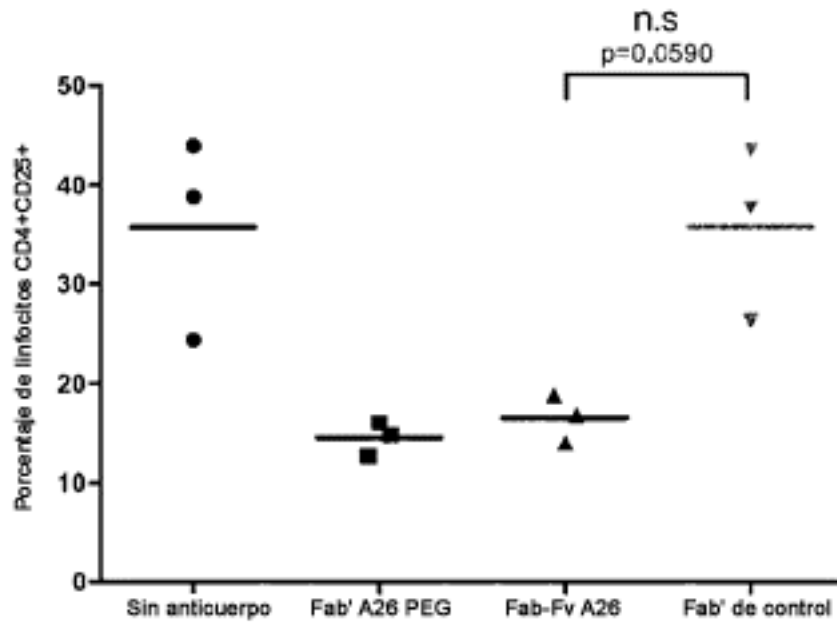


Figura 14A

Fab-Fv A26 administrado antes de la transferencia celular inhibe de forma dependiente de la dosis la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en el modelo Hu-NSG

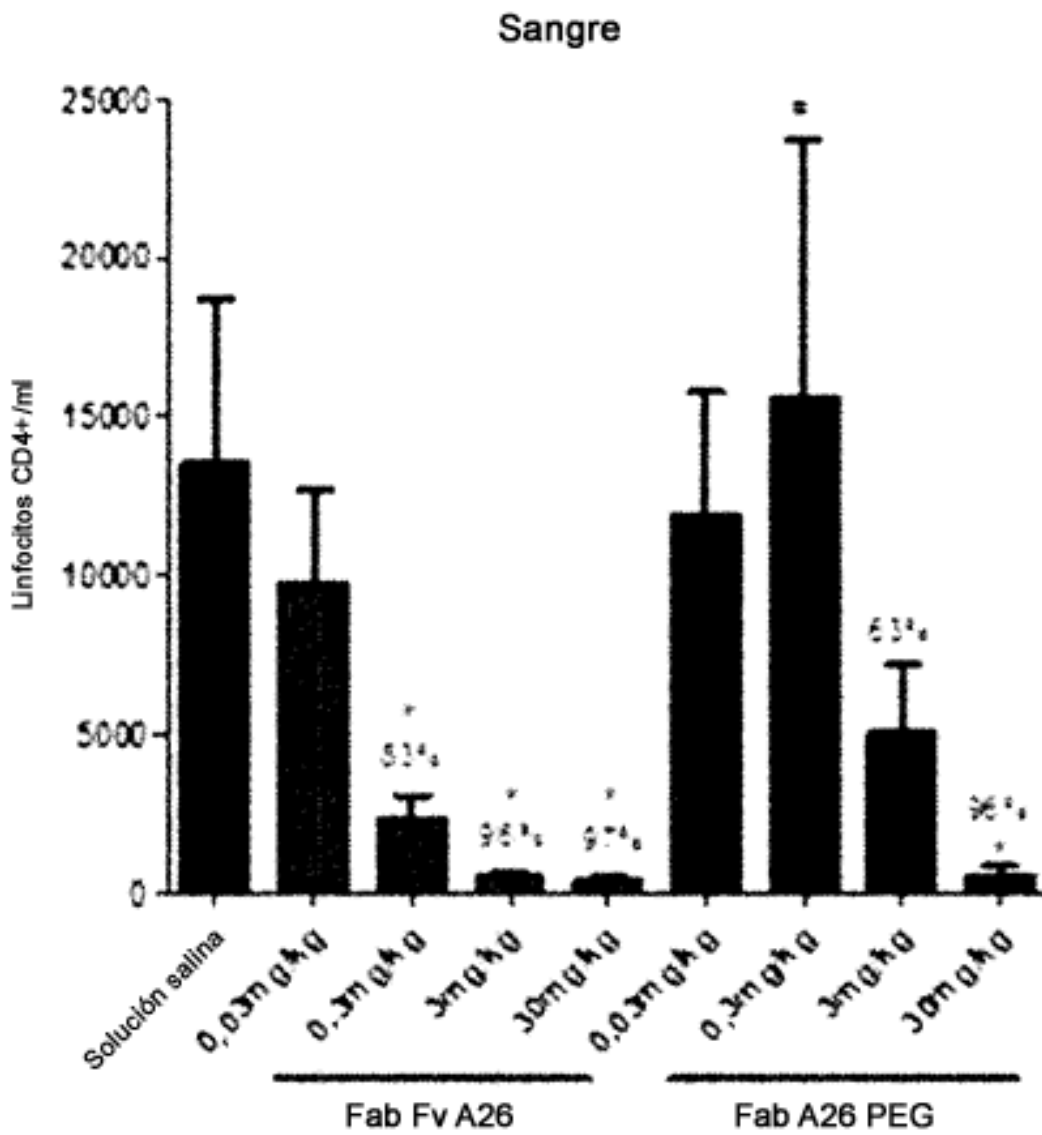


Figura 14B

Fab-Fv A26 administrado antes de la transferencia celular inhibe la proliferación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el modelo Hu-NSG

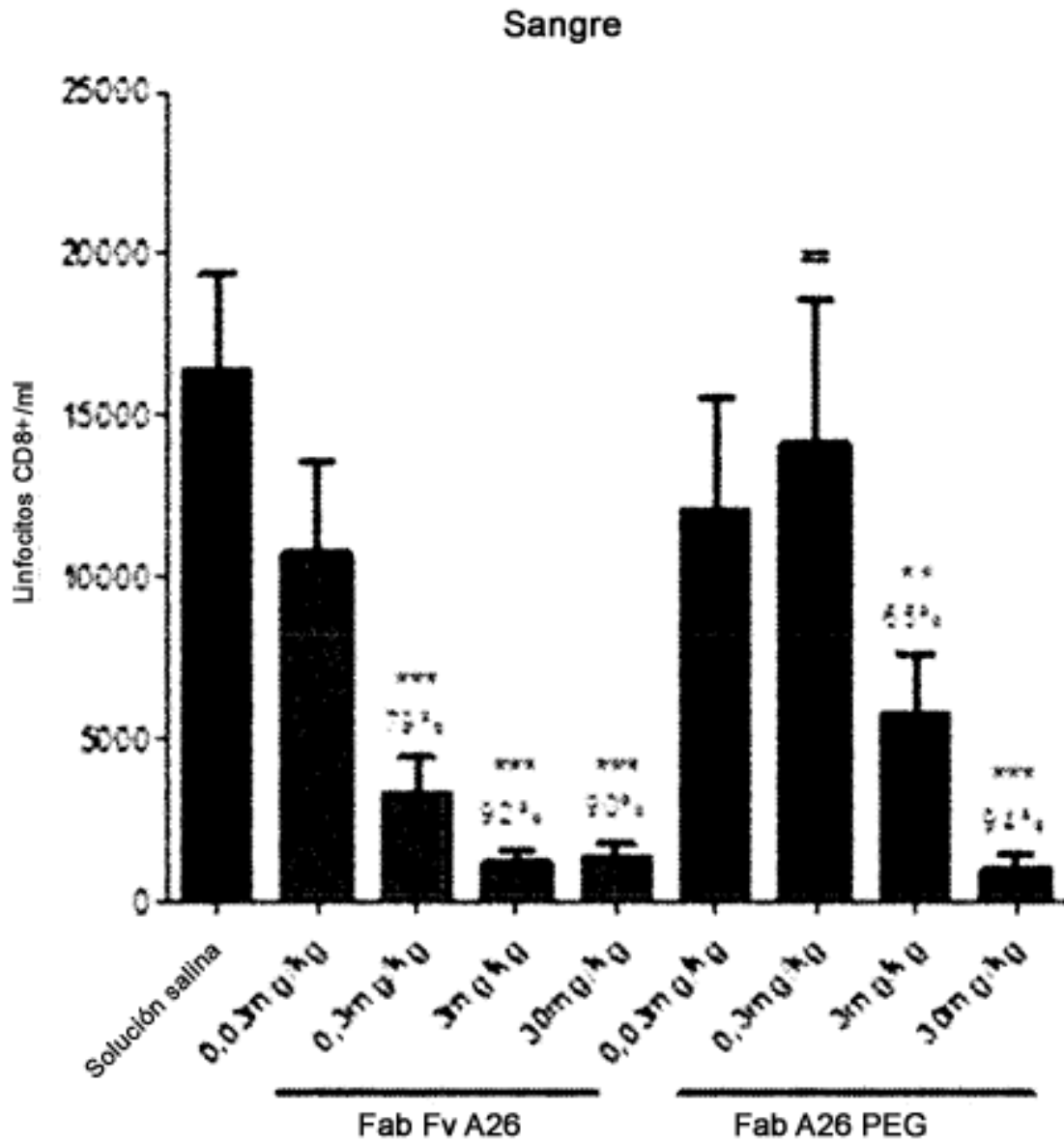


Figura 14C

Fab-Fv A26 administrado antes de la transferencia celular inhibe de forma dependiente de la dosis la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en el modelo Hu-NSG

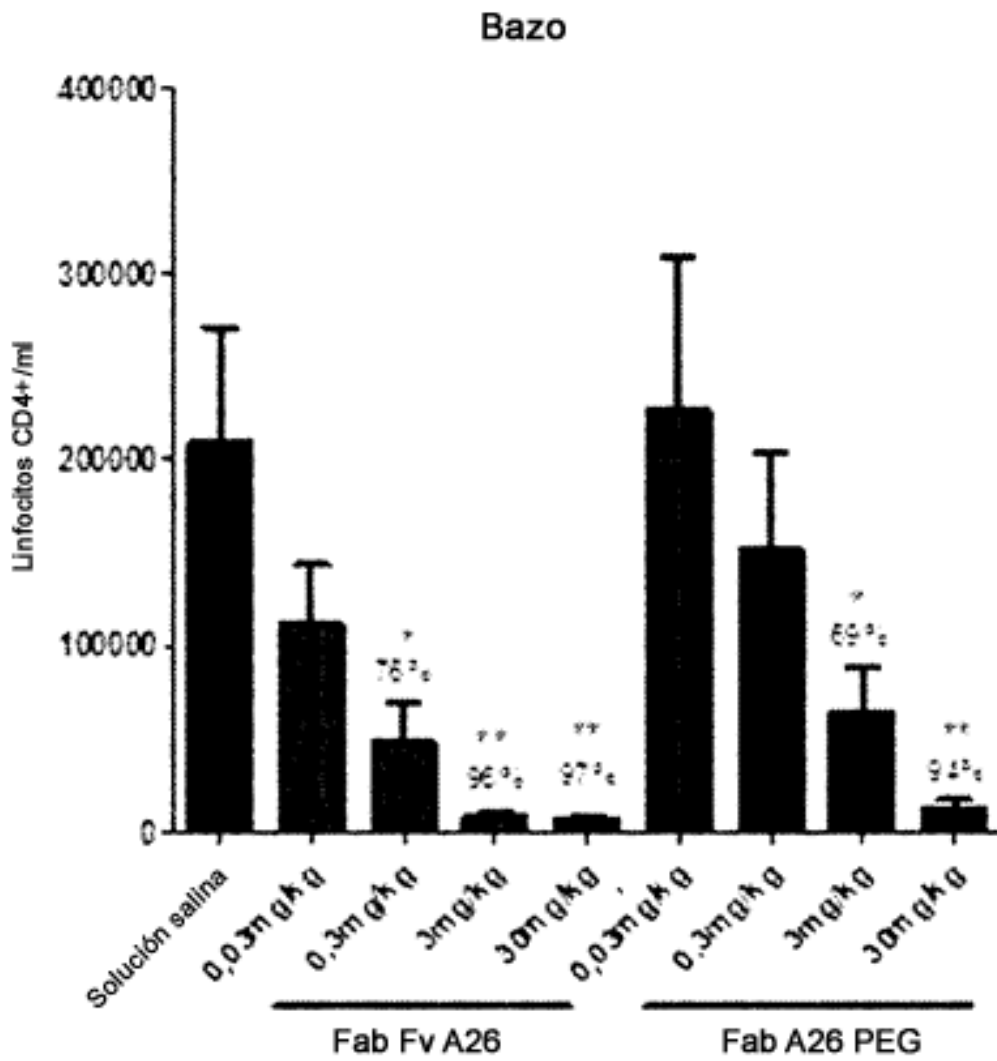


Figura 14D

Fab-Fv A26 administrado antes de la transferencia celular inhibe de forma dependiente de la dosis la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en el modelo Hu-NSG

