

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 527**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2016 PCT/EP2016/050308**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2016 WO16110584**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2016 E 16700136 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3242890**

54 Título: **Agentes agonistas de unión al receptor de TNF**

30 Prioridad:

08.01.2015 WO PCT/EP2015/050255

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

22.04.2020

73 Titular/es:

**BIONTECH SE (50.0%)
An der Goldgrube 12
55131 Mainz, DE y
GENMAB A/S (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SAHIN, UGUR;
GIESEKE, FRIEDERIKE;
ALTINTAS, ISIL;
SATIJN, DAVID y
PARREN, PAUL**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 755 527 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

Agentes agonistas de unión al receptor de TNF

Campo técnico

5 La presente enseñanza se refiere a agentes de unión que se unen a receptores de la superfamilia de TNF, en particular a agentes de unión que se unen a al menos dos receptores diferentes de la superfamilia de TNF, así como a su uso en medicina. La presente enseñanza se refiere además a moléculas de ácido nucleico que codifican TALEs agentes de unión, a células que comprenden tales moléculas de ácido nucleico y a composiciones y kits farmacéuticos.

Antecedentes

10 Los receptores para los ligandos de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) son proteínas transmembrana de tipo I o tipo III oligoméricas, en su mayoría triméricas, y contienen de uno a seis dominios ricos en cisteína (CRDs) en su dominio extracelular (Naismith J.H. and Sprang S.R. (1998), TRENDS in Biochemical Sciences 23(2):74-79). Además, varios receptores para los ligandos de la superfamilia de TNF contienen dominios de muerte (DD) que reclutan proteínas que interactúan con la caspasa después de la unión del ligando para iniciar la ruta extrínseca de activación de la caspasa.

15 Se han identificado numerosos receptores de la superfamilia de TNF hasta ahora, incluyendo 4-1BB (CD137), BAFFR, BCMA, CD27, CD30, CD40, DCR3, DR3 (TRAMP), DR6, EDAR, Fas (CD95), FN14 (TWEAK- R), GITR, HVEM, LT β R, NGFR (CD271), OPG, OX40 (CD134), RANK (TRANCE-R), RELT, TACI, TNFR1, TNFR2, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL- R4, TROY y XEDAR (Bodmer, JL et al. (2002), TRENDS in Biochemical Sciences, 27 (1): 19-26).

20 A través de la expresión oportuna y la señalización compleja, los receptores de la superfamilia de TNF y sus ligandos correspondientes actúan para regular las respuestas celulares, incluida la activación, proliferación, diferenciación y apoptosis. Si bien es fundamental para la regulación de procesos beneficiosos, tales como la defensa inmune y la hematopoyesis, la señalización de TNF también está implicada en la tumorigénesis, el rechazo de trasplantes, la replicación del virus, la resorción ósea, la diabetes y las enfermedades autoinmunes. La técnica anterior también describe anticuerpos monoespecíficos dirigidos a muchos de los miembros de la superfamilia de TNF y sugiere el uso de estos anticuerpos para tratar diversas enfermedades. Westwood et al. (2014) (Leukemia Research 38: 948-954), por ejemplo, describe un modelo de ratón para el mieloma múltiple que se basa en una terapia de combinación que comprende la administración de un primer anticuerpo monoclonal dirigido a CD40 y un segundo anticuerpo monoclonal dirigido a CD137.

30 Los agentes agonistas que se unen específicamente a uno o más receptores de la superfamilia de TNF se consideran como terapéuticos potenciales en la prevención y/o el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos.

En consecuencia, fue un objeto de la presente enseñanza proporcionar novedosos agentes de unión agonistas direccionados a receptores de la superfamilia de TNF, en particular agentes de unión agonistas direccionados al menos a dos receptores diferentes de la superfamilia de TNF.

Resumen

35 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, la presente enseñanza se refiere a un agente de unión que comprende al menos dos dominios de unión, en donde un primer dominio de unión se une a un primer receptor de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y un segundo dominio de unión se une a un segundo receptor de la superfamilia de TNF, en donde el primer receptor y el segundo receptor son diferentes.

40 En un aspecto, el agente de unión es un agente de unión agonista.

En un aspecto, el agente de unión es una molécula biespecífica, preferiblemente un anticuerpo biespecífico.

En un aspecto, el agente de unión está en el formato de un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo.

45 En un aspecto, el primer receptor y el segundo receptor se seleccionan del grupo que consiste en CD40, CD27, OX40 (CD134) y 4-1BB (CD137).

En un aspecto, el primer dominio de unión o el segundo dominio de unión se une a CD27, en donde el agente de unión comprende

(a) las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3, y/o

50 las regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en AB27_1 a AB27_186 como se muestra en la Tabla 7; y/o

ES 2 755 527 T3

- (b) el dominio variable de cadena pesada (VH) o una variante o fragmento del mismo y/o el dominio variable de cadena ligera (VL) o una variante o fragmento del mismo de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en AB27_1 a AB27_186 como se muestra en la Tabla 7)
- 5 En un aspecto, el primer dominio de unión o el segundo dominio de unión se une a OX40 (CD134), en donde el agente de unión comprende
- (a) las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3, y/o las regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en AB134_1 a AB134_92 como se muestra en la Tabla 8; y/o
- 10 (b) el dominio variable de cadena pesada (VH) o una variante o fragmento del mismo y/o el dominio variable de cadena ligera (VL) o una variante o fragmento del mismo de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en AB134_1 a AB134_92 como se muestra en la Tabla 8.
- En un aspecto, el primer dominio de unión o el segundo dominio de unión se une a 4-1BB (CD137), en donde el agente de unión comprende
- (a) las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3, y/o
- 15 las regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en AB137_1 a AB137_12 como se muestra en la Tabla 9; y/o
- (b) el dominio variable de cadena pesada (VH) o una variante o fragmento del mismo y/o el dominio variable de cadena ligera (VL) o una variante o fragmento del mismo de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en AB137_1 a AB137_12 como se muestra en la Tabla 9.
- 20 En un aspecto, el primer dominio de unión o el segundo dominio de unión se une a CD40, en donde el agente de unión comprende
- (a) regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada HCDR1 que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2323, HCDR2 que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2324 y/o HCDR3 que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2325, y/o
- 25 regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera LCDR1 que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2326, LCDR2 que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2327 y/o LCDR3 que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2328; y/o
- (b) dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2321 o una variante o fragmento del mismo y/o dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2322 o un variante o fragmento del mismo.
- 30 En un aspecto
- (a) el primer dominio de unión se une a CD40 y el segundo dominio de unión se une a CD27;
- (b) el primer dominio de unión se une a CD40 y el segundo dominio de unión se une a OX40 (CD134);
- (c) el primer dominio de unión se une a CD40 y el segundo dominio de unión se une a 4-1BB (CD137);
- 35 d) el primer dominio de unión se une a 4-1BB (CD137) y el segundo dominio de unión se une a CD27;
- (e) el primer dominio de unión se une a 4-1BB (CD137) y el segundo dominio de unión se une a OX40 (CD134); o
- (f) el primer dominio de unión se une a OX40 (CD134) y el segundo dominio de unión se une a CD27.
- En un aspecto, el agente de unión comprende uno o más dominios constantes de cadena pesada de una inmunoglobulina y/o dominios constantes de cadena ligera de una inmunoglobulina.
- 40 En otro aspecto, la presente enseñanza se refiere a un agente de unión que se une a CD27, que comprende
- (a) las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3, y/o las regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en AB27_1 a AB27_186 como se muestra en la Tabla 7; y/o
- 45 (b) el dominio variable de cadena pesada (VH) o una variante o fragmento del mismo y/o el dominio variable de cadena ligera (VL) o una variante o fragmento del mismo

de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en AB27_1 a AB27_186 como se muestra en la Tabla 7.

En otro aspecto, la presente enseñanza se refiere a un agente de unión que se une a OX40 (CD134), que comprende

(a) las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3, y/o

5 las regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en AB134_1 a AB134_92 como se muestra en la Tabla 8; y/o

(b) el dominio variable de cadena pesada (VH) o una variante o fragmento del mismo y/o el dominio variable de cadena ligera (VL) o una variante o fragmento del mismo

de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en AB134_1 a AB134_92 como se muestra en la Tabla 8.

En otro aspecto, la presente enseñanza se refiere a un agente de unión que se une a 4-1BB (CD137), que comprende

10 (a) las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3, y/o

las regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en AB137_1 a AB137_12 como se muestra en la Tabla 9; y/o

(b) el dominio variable de cadena pesada (VH) o una variante o fragmento del mismo y/o el dominio variable de cadena ligera (VL) o una variante o fragmento del mismo

15 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en AB137_1 a AB137_12 como se muestra en la Tabla 9.

En un aspecto, el agente de unión es un agente de unión agonista.

En un aspecto, el agente de unión está en el formato de un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo.

20 En un aspecto, el agente de unión comprende uno o más dominios constantes de cadena pesada de una inmunoglobulina y/o dominios constantes de cadena ligera de una inmunoglobulina.

En otro aspecto, la presente enseñanza se refiere a un agente de unión que se une a los mismos epítopos como un agente de unión como se definió anteriormente.

En otro aspecto, la presente enseñanza se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un agente de unión como se definió anteriormente, en donde, preferiblemente, la molécula de ácido nucleico está contenida en un vector.

25 En otro aspecto, la presente enseñanza se refiere a una célula que comprende una molécula de ácido nucleico como se definió anteriormente.

En otro aspecto, la presente enseñanza se refiere a una composición farmacéutica que comprende, como agente activo, un agente de unión como se definió anteriormente, una molécula de ácido nucleico como se definió anteriormente o una célula como se definió anteriormente.

30 En un aspecto, la composición farmacéutica comprende además un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente enseñanza se refiere a un kit que comprende un agente de unión como se definió anteriormente, una molécula de ácido nucleico como se definió anteriormente, una célula como se definió anteriormente o una composición farmacéutica como se definió anteriormente.

35 En otro aspecto, la presente enseñanza se refiere a un agente de unión como se definió anteriormente, una molécula de ácido nucleico como se definió anteriormente, una célula como se definió anteriormente o una composición farmacéutica como se definió anteriormente para uso como medicamento.

40 En otro aspecto, la presente enseñanza se refiere a un agente de unión como se definió anteriormente, una molécula de ácido nucleico como se definió anteriormente, una célula como se definió anteriormente o una composición farmacéutica como se definió anteriormente para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste de cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, trastornos autoinmunes, enfermedades degenerativas, enfermedades asociadas a la apoptosis y rechazos de trasplantes.

Breve descripción de las figuras

45

La Figura 1 muestra curvas de unión de anticuerpos de referencia contra CD27, CD134 y CD137 a la proteína recombinante respectiva, según se determina mediante un ensayo de inmunosorbente ligado a enzima (ELISA).

La Figura 2 muestra la expresión de CD27, CD134 y CD137 en la superficie celular de las líneas celulares HT1080 que sobreexpresan CD27, CD134 y CD137, respectivamente, según se determina por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

La Figura 3 muestra curvas de unión de anticuerpos de referencia contra CD27, CD134 y CD137 a CD27, CD134 y CD137 expresados en la superficie celular de las líneas celulares HT1080 correspondientes, según se determina mediante un ensayo de unión celular.

La Figura 4 muestra la curva de activación de un anticuerpo de referencia anti-CD27 agonista con o sin entrecruzamiento, según se determina mediante ELISA que mide la concentración de IL-8 en los sobrenadantes de células HT1080 que sobreexpresan CD27.

La Figura 5 muestra curvas de activación de ejemplo de anticuerpos anti-CD27, anti-CD134 y anti-CD137 agonistas bajo condiciones de entrecruzamiento, según se determina mediante ELISA que mide la concentración de IL-8 en los sobrenadantes de células HT1080 que sobreexpresan diana.

La Figura 6 muestra la expresión de CD27, CD40, CD134 y CD137 en la superficie celular de transfectantes estables de células HEK293_NFK_gfp_luc (A) y de transfectantes estables de células K562 (B) que sobreexpresan CD27, CD40, CD134 y CD137, respectivamente, según lo determinado por FACS (curvas blancas: control sin anticuerpo; curvas grises: tinción de anticuerpos).

La Figura 7 muestra el análisis de dos ejemplos (A y B) de un anticuerpo biespecífico direccionado simultáneamente a CD40 y CD137 (CD137xCD40). La activación de CD137 se midió mediante la actividad de luciferasa (unidades de luz relativas, RLU) de HEK293_NFK_CD137_gfp_luc tras la incubación con anticuerpos biespecíficos indicados y K562_CD40 para la presentación trans o K562_wt para el control. La activación de CD40 se midió mediante la actividad de luciferasa (RLU) de HEK293_NFK_CD40_gfp_luc tras la incubación con los anticuerpos biespecíficos indicados y K562_CD137 para la presentación trans o K562_wt para el control. Los dos anticuerpos monoespecíficos bivalentes parentales (CD137 IgG1 o CD40 IgG1) y (ii) los dos anticuerpos monovalentes con un brazo irrelevante (control CD137 x, control CD40 x) sirvieron como controles para los anticuerpos biespecíficos CD137xCD40. Solo los anticuerpos biespecíficos CD137xCD40 dieron como resultado la activación de CD137 y CD40 tras la presentación trans mediante CD40 y CD137, respectivamente. Las secuencias usadas de dominios variables de anticuerpos anti-CD137 y anti-CD40 se identifican por la abreviatura AB137 y AB40, respectivamente.

La Figura 8 muestra el análisis de un anticuerpo biespecífico direccionado simultáneamente a CD40 y CD27 (CD27xCD40). La activación de CD27 se midió mediante la actividad de luciferasa (RLU) de HEK293_NFK_CD27_gfp_luc tras la incubación con el anticuerpo biespecífico indicado y K562_CD40 para la presentación trans o K562_wt para el control. La activación de CD40 se midió mediante la actividad de luciferasa (RLU) de HEK293_NFK_CD40_gfp_luc tras la incubación con el anticuerpo biespecífico indicado y K562_CD27 para la presentación trans o K562_wt para el control. Los dos anticuerpos monoespecíficos bivalentes parentales (IgG1 CD27 o IgG1 CD40) y (ii) los dos anticuerpos monovalentes con un brazo irrelevante (control CD27 x, control CD40 x) sirvieron como controles para el anticuerpo biespecífico CD27xCD40. El anticuerpo biespecífico CD27xCD40 dio como resultado activación superior de CD27 y CD40 tras la presentación trans por CD40 y CD27, respectivamente. Las secuencias usadas de dominios variables de anticuerpos anti-CD27 y anti-CD40 se identifican por la abreviatura AB27 y AB40, respectivamente.

La Figura 9 muestra el análisis de dos ejemplos (A y B) de un anticuerpo biespecífico direccionado simultáneamente a CD40 y CD134 (CD134xCD40). La activación de CD134 se midió mediante la actividad de luciferasa (RLU) de HEK293_NFK_CD134_gfp_luc tras la incubación con anticuerpos biespecíficos indicados y K562_CD40 para la presentación trans o K562_wt para el control. La activación de CD40 se midió mediante la actividad de luciferasa (RLU) de HEK293_NFK_CD40_gfp_luc tras la incubación con anticuerpos y K562_CD134 para la presentación trans o K562_wt para el control. Los dos anticuerpos monoespecíficos bivalentes parentales (CD134 IgG1 o CD40 IgG1) y (ii) los dos anticuerpos monovalentes con un brazo irrelevante (control CD134 x, control CD40 x) sirvieron como controles para los anticuerpos biespecíficos CD134xCD40. Los anticuerpos biespecíficos CD134xCD40 dieron como resultado activación superior de CD134 y CD40 tras la presentación trans por CD40 y CD134, respectivamente. Las secuencias usadas de dominios variables de anticuerpos anti-CD134 y anti-CD40 se identifican por la abreviatura AB134 y AB40, respectivamente.

La Figura 10 muestra la expresión de CD27, CD134 y CD137 en la superficie celular de transfectantes dobles de células HEK293_NFK_gfp_luc que sobreexpresan CD27 + CD134 (HEK293_NFK_CD27_CD134_gfp_luc), CD134 + CD137 (HEK293_NFK_CD134_CD137_gfp_luc) y CD27 + CD137 (HEK293_NFK_CD27_CD137_gfp_luc), respectivamente, como se determina por FACS (curvas blancas: control sin anticuerpo; curvas grises: tinción de anticuerpos).

La Figura 11 muestra el análisis de un anticuerpo biespecífico direccionado simultáneamente a CD27 y CD134 (CD134xCD27). La activación de CD27 y CD134 se midió mediante la actividad de luciferasa de

HEK293_NFK_CD27_CD134_gfp_luc tras la incubación con el anticuerpo biespecífico indicado; se muestran las RLU máximas. Los dos anticuerpos mono-específicos bivalentes parentales (CD134 IgG1 o CD27 IgG1) y (ii) los dos anticuerpos monovalentes con un brazo irrelevante (control CD134 x, control CD27 x) sirvieron como controles para el anticuerpo biespecífico CD134xCD27. El anticuerpo biespecífico CD134xCD27 dio como resultado activación superior de HEK293_NFK_CD27_CD134_gfp_luc en comparación con los cuatro controles correspondientes. Las secuencias usadas de dominios variables de anticuerpos anti-CD134 y anti-CD27 se identifican por la abreviatura AB134 y AB27, respectivamente.

La Figura 12 muestra el análisis de dos ejemplos (A y B) de un anticuerpo biespecífico direccionado simultáneamente a CD134 y CD137 (CD134xCD137). La activación de CD134 y CD137 se midió mediante la actividad de luciferasa de HEK293_NFK_CD134_CD137_gfp_luc tras la incubación con los anticuerpos biespecíficos indicados; se muestran las RLU máximas. Los dos anticuerpos mono-específicos bivalentes parentales (CD134 IgG1 o CD137 IgG1) y (ii) los dos anticuerpos monovalentes con un brazo irrelevante (control CD134 x, control CD137 x) sirvieron como controles para los anticuerpos biespecíficos CD134xCD137. Los anticuerpos biespecíficos CD134xCD137 dieron como resultado la activación de HEK293_NFK_CD134_CD137_gfp_luc, mientras que los cuatro controles correspondientes no dieron como resultado una activación medible del doble transfectante. Las secuencias usadas de dominios variables de anticuerpos anti-CD134 y anti-CD137 se identifican por la abreviatura AB134 y AB137, respectivamente.

La Figura 13 muestra el análisis de dos ejemplos (A y B) de un anticuerpo biespecífico direccionado simultáneamente a CD27 y CD137 (CD137xCD27). La activación de CD27 y CD137 se midió mediante la actividad de luciferasa de HEK293_NFK_CD27_CD137_gfp_luc tras la incubación con los anticuerpos biespecíficos indicados; se muestran las RLU máximas. Los dos anticuerpos mono-específicos bivalentes parentales (CD137 IgG1 o CD27 IgG1) y (ii) los dos anticuerpos monovalentes con un brazo irrelevante (CD137 x control, CD27 x control) sirvieron como controles para los anticuerpos biespecíficos CD137xCD27. Los anticuerpos biespecíficos CD137xCD27 dieron como resultado una activación superior de HEK293_NFK_CD27_CD137_gfp_luc en comparación con los dos anticuerpos de control con un brazo irrelevante. Las secuencias usadas de dominios variables de anticuerpos anti-CD137 y anti-CD27 se identifican por la abreviatura AB137 y AB27, respectivamente.

Descripción detallada

Aunque la presente enseñanza se describe en detalle a continuación, debe entenderse que esta enseñanza no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos aquí, ya que pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, el cual estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica.

A continuación, se describirán los elementos de la presente enseñanza. Estos elementos se enumeran con realizaciones específicas, sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. Los ejemplos descritos de manera diversa y las realizaciones preferidas no deben interpretarse para limitar la presente enseñanza a solamente las realizaciones descritas explícitamente. Debe entenderse que esta descripción soporta y abarca realizaciones que combinan las realizaciones descritas explícitamente con cualquier número de los elementos divulgados y/o preferidos. Adicionalmente, cualesquier permutaciones y combinaciones de todos los elementos descritos en esta solicitud deben considerarse divulgados por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto indique otra cosa.

Preferiblemente, los términos utilizados en este documento se definen como se describe en A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Suiza, (1995).

La práctica de la presente enseñanza empleará, a menos que se indique otra cosa, métodos convencionales de química, bioquímica, biología celular, inmunología y técnicas de ADN recombinante que se explican en la literatura en el campo (véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual). , 2ª edición, J. Sambrook et al. Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

A lo largo de esta especificación y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra "comprende" y variaciones tales como "comprenden" y "que comprende" implican la inclusión de un miembro, entero o etapa o grupo establecido de miembros, enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro miembro, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas, aunque en algunas realizaciones se puede excluir tal otro miembro, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas, es decir el asunto objeto consiste en la inclusión de un miembro, entero o etapa o grupo establecido de miembros, enteros o etapas. Los términos "un" y "uno, una" y "el, la" y referencias similares utilizados en el contexto de la descripción de la enseñanza (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique otra cosa aquí o claramente contradicho por el contexto. La indicación de rangos de valores en el presente documento solo pretende servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del rango. A menos que se indique otra cosa en este documento, cada valor individual se entiende como si se indicara individualmente en este documento. Todos los métodos descritos en este documento pueden realizarse

en cualquier orden adecuado a menos que se indique otra cosa en este documento o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje de ejemplo (por ejemplo, "tal como"), provisto en este documento tiene la intención simplemente de ilustrar mejor la enseñanza y no plantea una limitación en el alcance de la invención reivindicada de otra manera. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como que indica cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

Se citan varios documentos a lo largo del texto de esta especificación. Cada uno de los documentos aquí citados (incluidas todas las patentes, solicitudes de patentes, publicaciones científicas, especificaciones del fabricante, instrucciones, etc.), ya sea supra o infra, se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a anteceder tal divulgación en virtud de la invención anterior.

El término "receptor de la superfamilia de TNF" se refiere preferiblemente a un receptor seleccionado del grupo que consiste en 4-1BB (CD137), BAFFR, BCMA, CD27, CD30, CD40, DCR3, DR3 (TRAMP), DR6, EDAR, Fas (CD95), FN14 (TWEAK-R), GITR, HVEM, LT β R, NGFR (CD271), OPG, OX40 (CD134), RANK (TRANCE-R), RELT, TACI, TNFR1, TNFR2, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, TROY y XEDAR.

El término "receptor de la superfamilia de TNF", como se usa en el presente documento, también incluye variantes de un receptor dado de la superfamilia de TNF.

El término "variante" de acuerdo con la enseñanza se refiere, en particular, a mutantes, variantes de empalme, variantes de conformación, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular los que están naturalmente presentes. Una variante alélica se relaciona con una alteración en la secuencia normal de un gen, cuya importancia a menudo no está clara. La secuenciación genética completa a menudo identifica numerosas variantes alélicas para un gen dado. Un homólogo de especie es una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos con una especie diferente de origen de la de una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos dada. El término "variante" abarcará todas las variantes modificadas postraduccionalmente y las variantes de conformación.

De acuerdo con la presente enseñanza, el primer receptor y el segundo receptor de la superfamilia de TNF se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en CD40, CD27, OX40 (CD134) y 4-1BB (CD137).

CD40, también denominado como miembro 5 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF5), es el receptor para el ligando TNFSF5/CD40L. Se sabe que CD40 transduce señales mediadas por TRAF6 y MAP3K8 que activan ERK en macrófagos y células B, lo que conduce a la inducción de la secreción de inmunoglobulina. En una realización, CD40 es CD40 humano, que tiene el número de acceso UniProt P25942.

CD27, también denominado como TNFRSF7, es el receptor para el ligando CD70/CD27L. Se cree que CD27 juega un papel en la supervivencia de las células T activadas y un papel en la apoptosis a través de la asociación con SIVA1. En una realización, CD27 es CD27 humano, que tiene el número de acceso UniProt P26842.

OX40 (CD 134), también denominado como TNFRSF4, es el receptor para el ligando TNFSF4/OX40L/GP34. OX40 (CD134) es una molécula coestimuladora implicada en la inmunidad de células T a largo plazo. En una realización, OX40 (CD134) es OX40 humano (CD134), que tiene el número de acceso UniProt P43489.

4-1BB (CD137), también denominado como TNFRSF9, es el receptor para el ligando TNFSF9/4-1BBL. Se cree que 4-1BB (CD137) está involucrado en la activación de las células T. En una realización, 4-1BB (CD137) es 4-1BB humano (CD137), que tiene el número de acceso UniProt Q07011.

El término "dominio de unión" se caracteriza en relación con la presente enseñanza de una estructura, por ejemplo, de un anticuerpo, que se une/interactúa con una estructura/antígeno/epítipo diana dado. Por lo tanto, el dominio de unión de acuerdo con la enseñanza designa un "sitio de interacción de antígeno" o "sitio de unión de antígeno".

El término "antígeno" se refiere a un agente tal como una proteína o péptido que comprende un epítipo contra el cual se dirige y/o es para ser dirigida una respuesta inmune.

El término "péptido" de acuerdo con la enseñanza comprende oligo- y polipéptidos y se refiere a sustancias que comprenden dos o más, preferiblemente 3 o más, preferiblemente 4 o más, preferiblemente 6 o más, preferiblemente 8 o más, preferiblemente 9 o más, preferiblemente 10 o más, preferiblemente 13 o más, preferiblemente 16 más, preferiblemente 21 o más y hasta preferiblemente 8, 10, 20, 30, 40 o 50, en particular 100 aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. El término "proteína" se refiere a péptidos grandes, preferiblemente a péptidos con más de 100 residuos de aminoácidos, pero en general los términos "péptidos" y "proteínas" son sinónimos y se usan indistintamente en el presente documento.

El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico en una molécula, es decir, a la parte en una molécula que es reconocida por el sistema inmune, por ejemplo, que es reconocida por un anticuerpo. Por ejemplo, los epítopos son los sitios tridimensionales discretos en un antígeno, que son reconocidos por el sistema inmune. Los epítopos usualmente consisten en agrupaciones de moléculas químicamente activas en la superficie, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y usualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así

como características de carga específicas. Los epítomos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes. Un epítomo de una proteína comprende preferiblemente una porción continua o discontinua de dicha proteína y está preferiblemente entre 5 y 100, preferiblemente entre 5 y 50, más preferiblemente entre 8 y 30, lo más preferiblemente entre 10 y 25 aminoácidos de longitud, por ejemplo, el epítomo puede tener preferiblemente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud.

El mapeo de los epítomos reconocidos por los agentes de unión se puede realizar como se describe en detalle en "Epitope Mapping Protocols" (Methods in Molecular Biology) by Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9 and in "Epitope Mapping: A Practical Approach" Practical Approach Series, 248 by Olwyn M. R. Westwood, Frank C. Hay.

El término "agente de unión agonista", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente de unión, el cual activa el receptor o receptores de la superfamilia de TNF a la que se une. En una realización, el agente de unión induce la liberación de IL-8 y/o activa la ruta de NF- κ B en las células que expresan los receptores de la superfamilia de TNF a la que se une. En una realización, el agente de unión es un agente de unión de activación trans, que activa simultáneamente receptores de la superfamilia de TNF, por ejemplo, dicho primer y segundo receptor, ubicados en diferentes células. En otra realización, el agente de unión es un agente de unión de activación cis, que activa simultáneamente receptores de la superfamilia de TNF, por ejemplo, dicho primer y segundo receptor, ubicados en la misma célula.

El término "unión" de acuerdo con la enseñanza se refiere preferiblemente a una unión específica. Un agente de unión, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo, es específico para un objetivo predeterminado si es capaz de unirse a dicho objetivo predeterminado mientras que no es (sustancialmente) capaz de unirse a otros objetivos.

De acuerdo con la presente enseñanza, un agente de unión, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo, es capaz de unirse a un objetivo predeterminado si tiene una afinidad significativa por dicho objetivo predeterminado y se une a dicho objetivo predeterminado en ensayos estándar. La "afinidad" o "afinidad de unión" a menudo se mide por la constante de disociación de equilibrio (K_D). Preferiblemente, el término "afinidad significativa" se refiere a la unión a un objetivo predeterminado con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} M o inferior, 10^{-6} M o inferior, 10^{-7} M o inferior, 10^{-8} M o inferior, 10^{-9} M o inferior, 10^{-10} M o inferior, 10^{-11} M o inferior, o 10^{-12} M o inferior.

Un agente no es (sustancialmente) capaz de unirse a un objetivo si no tiene una afinidad significativa por dicho objetivo y no se une significativamente, en particular no se une de forma detectable, a dicho objetivo en ensayos estándar. Preferiblemente, el agente no se une de manera detectable a dicho objetivo si está presente en una concentración de hasta 2, preferiblemente 10, más preferiblemente 20, en particular 50 o 100 μ g/ml o más. Preferiblemente, un agente no tiene una afinidad significativa por un objetivo si se une a dicho objetivo con un K_D que es al menos 10 veces, 100 veces, 10^3 veces, 10^4 veces, 10^5 veces o 10^6 veces mayor que la K_D para unirse al objetivo predeterminado al que el agente es capaz de unirse. Por ejemplo, si la K_D para la unión de un agente al objetivo al que el agente es capaz de unirse es 10^{-7} M, la K_D para la unión a un objetivo para el cual el agente no tiene una afinidad significativa sería al menos 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, o 10^{-1} M.

La unión de un agente a un objetivo puede determinarse experimentalmente utilizando cualquier método adecuado; véase, por ejemplo, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kubly, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992), y los métodos descritos en este documento. Las afinidades pueden determinarse fácilmente usando técnicas convencionales, tales como por diálisis de equilibrio; utilizando el instrumento BIAcore 2000, utilizando los procedimientos generales delineados por el fabricante; por radioinmunoensayo utilizando antígeno diana radiomarcado; o por otro método conocido por el experto en la técnica. Los datos de afinidad pueden analizarse, por ejemplo, por el método de Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51: 660 (1949). La afinidad medida de una interacción antígeno-anticuerpo particular puede variar si se mide bajo diferentes condiciones, por ejemplo, concentración de sal, pH. Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión a antígeno, por ejemplo, K_D , IC_{50} , se realizan preferiblemente con soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un regulador estandarizado.

El término "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por uniones disulfuro. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y combinaciones de cualquiera de los anteriores. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (CH). Cada cadena ligera se compone de una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL). Las regiones variables y las regiones constantes también se denominan aquí dominios variables y dominios constantes, respectivamente. Las regiones VH y VL se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FRs). Cada VH y VL está compuesto por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino al terminal carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las CDR de un VH se denominan HCDR1, HCDR2 y HCDR3, las CDR de un VL se denominan LCDR1, LCDR2 y LCDR3. Las regiones variables de cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de un anticuerpo comprenden la región constante de cadena pesada (CH) y la región constante de cadena ligera (CL), en

- 5 donde CH puede subdividirse adicionalmente en el dominio constante CH1, una región bisagra y dominios constantes CH2 y CH3 (dispuestos a partir del terminal amino a terminal carboxi en el siguiente orden: CH1, CH2, CH3). Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluidas diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.
- Los anticuerpos pueden derivarse de diferentes especies, incluidos, pero no limitados a, ratones, ratas, conejos, conejillos de indias y humanos.
- 10 Los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen IgA tal como anticuerpos IgA1 o IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM e IgD. En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, más particularmente un isotipo lambda IgG1, kappa o IgG1 (es decir, IgG1, κ , λ), un anticuerpo IgG2a, κ , λ), un anticuerpo IgG2b (por ejemplo, IgG2b, κ , λ), un anticuerpo IgG3 (por ejemplo, IgG3, κ , λ) o un anticuerpo IgG4 (por ejemplo, IgG4, κ , λ).
- Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por genes de región constante de cadena pesada. El "cambio de isotipo" se refiere al fenómeno por el cual la clase, o isotipo, de un anticuerpo cambia de una clase de Ig a una de las otras clases de Ig.
- 15 El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Un anticuerpo monoclonal muestra una especificidad y afinidad de unión única. En una realización, los anticuerpos monoclonales son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano, por ejemplo, un ratón, fusionado a una célula inmortalizada.
- 20 El término "anticuerpo recombinante", como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico con respecto a los genes de inmunoglobulina o un hibridoma preparado a partir de ellos, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos recombinantes, combinatorios y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.
- 25 El término "recombinante" en el contexto de la presente enseñanza significa "hecho a través de ingeniería genética". Preferiblemente, un "objeto recombinante", tal como un anticuerpo recombinante o ácido nucleico "no es de origen natural.
- 30 El término "de origen natural", como se usa en el presente documento, como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos que está presente en un organismo (incluidos los virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionalmente por el hombre en el laboratorio es de origen natural.
- 35 El término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio in vitro o por mutación somática in vivo).
- 40 El término "anticuerpo humanizado" se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno que se deriva sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, en la que la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión al antígeno puede comprender bien sea regiones variables completas (VH y VL) fusionadas en dominios constantes (por ejemplo, los dominios constantes de IgG1/ κ), o solo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) injertadas en regiones marco apropiadas en las regiones variables. Los sitios de unión a antígeno pueden ser de tipo salvaje o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo modificado para parecerse más a las inmunoglobulinas humanas. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR del anticuerpo de ratón). Otras formas tienen una o más CDR que están alteradas con respecto al anticuerpo original.
- 45 El término "anticuerpo quimérico" se refiere a aquellos anticuerpos en los que una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera es homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase particular, mientras que el segmento restante de la cadena es homóloga a las secuencias correspondientes en otra. Típicamente, la región variable tanto de las cadenas ligeras como pesadas imita las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpos derivados de otra. Una ventaja clara de tales formas quiméricas es que la región variable se puede derivar convenientemente de fuentes actualmente conocidas usando células B o hibridomas fácilmente disponibles de organismos huéspedes no humanos en combinación con regiones constantes derivadas, por ejemplo, de preparaciones de células humanas. Si bien la región variable tiene la ventaja de la facilidad de preparación y la especificidad no es afectada por la fuente, siendo la región constante humana, es menos probable que provoque una respuesta inmune de un sujeto humano cuando se
- 50
- 55

inyectan los anticuerpos que la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no se limita a este ejemplo particular.

Los anticuerpos descritos en el presente documento se aíslan preferiblemente. El término "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas. Sin embargo, un anticuerpo aislado que se usa específicamente a un epítipo, isoforma o variante de un receptor dado de la superfamilia de TNF puede tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de especies de dicho receptor). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno y también pueden denominarse "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión incluidos en el término "fragmento de anticuerpo" incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en las regiones VL, VH, CL y CH; (ii) fragmentos F(ab')₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que consisten en las regiones VH y CH; (iv) fragmentos Fv que consisten en las regiones VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) fragmentos dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consisten en una región VH; (vi) regiones determinantes de complementariedad aisladas (CDR) y (vii) combinaciones de dos o más CDR aisladas que pueden unirse opcionalmente por un enlazador sintético. Adicionalmente, aunque las dos regiones/dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificadas por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite formarse como una cadena de proteínas única en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véanse, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla también están destinados a estar abarcados dentro del término "fragmento de anticuerpo". Un ejemplo adicional es una proteína de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprende (i) un polipéptido de dominio de unión que se fusiona a un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH₂ de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región bisagra, y (iii) una región constante CH₃ de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región constante CH₂. El polipéptido del dominio de unión puede ser una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se describen adicionalmente en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan para utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Los términos "parte" o "fragmento" se usan indistintamente aquí y se refieren a un elemento continuo. Por ejemplo, una parte de una estructura tal como una secuencia de aminoácidos o proteína se refiere a un elemento continuo de dicha estructura. Una porción, una parte o un fragmento de una estructura comprende preferiblemente una o más propiedades funcionales de dicha estructura. Por ejemplo, una porción, una parte o un fragmento de un epítipo o péptido es preferiblemente inmunológicamente equivalente al epítipo o péptido del que deriva. Una parte o fragmento de una secuencia de proteína comprende preferiblemente una secuencia de al menos 6, en particular al menos 8, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 50 o al menos 100 aminoácidos consecutivos de la secuencia proteica.

Cuando se usa en conexión con los dominios VH y VL, el término "fragmento" se refiere preferiblemente a una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), preferiblemente al menos a la región variable CDR₃, de la región variable de cadena pesada (VH) y/o de la región variable de cadena ligera (VL). En una realización, dicha una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se seleccionan de un conjunto de regiones determinantes de complementariedad CDR₁, CDR₂ y CDR₃. En una realización particularmente preferida, el término "fragmento" se refiere a las regiones determinantes de complementariedad CDR₁, CDR₂ y CDR₃ de la región variable de cadena pesada (VH), es decir HCDR₁, HCDR₂ y HCDR₃, y/o de la región variable de cadena ligera (VL), es decir, LCDR₁, LCDR₂ y LCDR₃.

La enseñanza dada aquí con respecto a secuencias de aminoácidos específicas, por ejemplo, las que se muestran en el listado de secuencias, debe interpretarse de tal manera que también se relacione con variantes de dichas secuencias específicas que dan como resultado secuencias que son funcionalmente equivalentes a dichas secuencias específicas, por ejemplo, secuencias de aminoácidos que exhiben propiedades idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos específicas. Una propiedad importante es retener el enlace a un objetivo.

Por ejemplo, las secuencias que se muestran en el listado de secuencias pueden modificarse para eliminar uno o más, preferiblemente todos los residuos de cisteína libres, en particular reemplazando los residuos de cisteína por aminoácidos distintos de cisteína, preferiblemente serina, alanina, treonina, glicina, tirosina, leucina o metionina, más preferiblemente alanina o serina.

Los expertos en la técnica apreciarán que, en particular, las secuencias de las CDR y las regiones variables pueden modificarse sin perder la capacidad de unirse al primer y/o segundo receptor de la superfamilia de TNF. Por ejemplo,

las regiones CDR serán bien sea idénticas o altamente homólogas a las regiones de anticuerpos especificadas aquí. Por "altamente homólogo" se contempla que de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, tales como 1 a 3 o 1 o 2 sustituciones se pueden hacer en las CDR. Además, las regiones hipervariables y variables pueden modificarse de tal manera que muestren una homología sustancial con las regiones de anticuerpos específicamente divulgadas en este documento.

5 Para los propósitos de la presente enseñanza, las "variantes" de una secuencia de aminoácidos, en particular las variantes de un dominio variable de cadena pesada (VH) o de un dominio variable de cadena ligera (VL), comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de adición de aminoácidos, variantes de delección de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos. Las variantes de delección de aminoácidos que comprenden la delección en el terminal N y/o el terminal C de la proteína también se denominan variantes de truncamiento N-terminal y/o C-terminal.

Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden inserciones de uno o dos o más aminoácidos en una secuencia de aminoácidos particular. En el caso de las variantes de secuencia de aminoácidos que tienen una inserción, uno o más residuos de aminoácidos se insertan en un sitio particular en una secuencia de aminoácidos, aunque también es posible la inserción aleatoria con el cribado apropiado del producto resultante.

15 Las variantes de adición de aminoácidos comprenden fusiones de terminal amino y/o carboxi de uno o más aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos.

Las variantes de delección de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia, tal como la eliminación de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos. Las delecciones pueden estar en cualquier posición de la proteína.

20 Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan porque al menos un residuo en la secuencia se elimina y otro residuo se inserta en su lugar. Se da preferencia a las modificaciones que se encuentran en posiciones en la secuencia de aminoácidos que no se conservan entre proteínas o péptidos homólogos y/o al reemplazo de aminoácidos con otros que tienen propiedades similares. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos en variantes de proteínas son sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una sustitución conservadora de aminoácidos implica la sustitución de un aminoácido con otro de la misma familia de aminoácidos, es decir, aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales (por ejemplo, en términos de carga eléctrica y/o tamaño). Los aminoácidos de origen natural se dividen generalmente en cuatro familias: aminoácidos ácidos (aspartato, glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y sin carga polar (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos.

Preferiblemente, el grado de similitud, preferiblemente identidad entre una secuencia de aminoácidos dada y una secuencia de aminoácidos que es una variante de dicha secuencia de aminoácidos dada será al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 80%, 81%, 82 %, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%. El grado de similitud o identidad se da preferiblemente para una región de aminoácidos que es al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90% o aproximadamente 100% de la longitud total de la secuencia de aminoácidos de referencia. Por ejemplo, si la secuencia de aminoácidos de referencia consiste en 200 aminoácidos, el grado de similitud o identidad se da preferiblemente por al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 180 o aproximadamente 200 aminoácidos, preferiblemente aminoácidos continuos. En realizaciones preferidas, el grado de similitud o identidad se da para toda la longitud de la secuencia de aminoácidos de referencia. La alineación para determinar la similitud de secuencia, preferiblemente la identidad de secuencia se puede hacer con herramientas conocidas de la técnica, preferiblemente usando la mejor alineación de secuencias, por ejemplo, usando Align, usando configuraciones estándar, preferiblemente EMBOSS:: Needle, Matriz: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extender 0.5.

La "similitud de secuencia" indica el porcentaje de aminoácidos que son bien sea idénticos o que representan sustituciones conservadoras de aminoácidos. La "identidad de secuencia" entre dos secuencias de aminoácidos indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias.

El término "porcentaje de identidad" pretende denotar un porcentaje de residuos de aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenidas después de la mejor alineación, siendo este porcentaje puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen aleatoriamente y en toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se llevan a cabo convencionalmente comparando estas secuencias después de haberlas alineado de manera óptima, dicha comparación se lleva a cabo por segmento o por "ventana de comparación" con el fin de identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede producir, además de manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith and Waterman, 1981, *Ads App. Matemáticas*, 2, 482, mediante el algoritmo de homología local de Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, mediante el método de búsqueda de similitud

de Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl Acad. Sci. USA 85, 2444, o por medio de programas de ordenador que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

5 El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas entre las dos secuencias que se comparan, dividiendo este número por el número de posiciones comparadas y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

Los agentes de unión de acuerdo con la presente enseñanza pueden ser al menos biespecíficos o multiespecíficos, tales como triespecíficos, tetraspecíficos, y así sucesivamente.

10 El término "molécula biespecífica" se refiere a una molécula que tiene dos especificidades de unión diferentes y, por lo tanto, puede unirse a dos tipos diferentes de antígeno, tales como un primer y un segundo receptor de la superfamilia de TNF. Tal molécula biespecífica puede estar en el formato de una molécula de anticuerpo o de una molécula de tipo anticuerpo o de un andamiaje de proteínas con propiedades de tipo anticuerpo o de un péptido cíclico con al menos dos especificidades de unión.

15 El término "anticuerpo biespecífico", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que comprende dos sitios de unión a antígeno, un primer sitio de unión que tiene afinidad por un primer antígeno o epítipo y un segundo sitio de unión que tiene afinidad de unión por un segundo antígeno o epítipo distinto del primero. En particular, un anticuerpo biespecífico es una proteína artificial que está compuesta de fragmentos de dos anticuerpos diferentes (dichos fragmentos de dos anticuerpos diferentes que forman dos dominios de unión) y, en consecuencia, se une a dos tipos diferentes de antígeno.

20 Una molécula/anticuerpo biespecífico de acuerdo con la enseñanza está modificada por ingeniería genética para unirse simultáneamente a un primer receptor de la superfamilia de TNF y a un segundo receptor de la superfamilia de TNF, en donde el primer receptor y el segundo receptor son diferentes y pueden estar ubicados en la misma célula ("cis") o células diferentes ("trans").

25 En una realización, el primer receptor y el segundo receptor están ubicados en la misma célula y se seleccionan del grupo que consiste en CD27, OX40 (CD134) y 4-1BB (CD137). En una realización, dicha célula es una célula T.

30 En otra realización, el primer receptor y el segundo receptor están ubicados en diferentes células, en donde el primer receptor es CD40 y el segundo receptor se selecciona del grupo que consiste en CD27, OX40 (CD134) y 4-1BB (CD137). En una realización, dichas células diferentes son una célula presentadora de antígeno (APC), tal como una célula dendrítica, que expresa CD40 y una célula T que expresa el segundo receptor seleccionado del grupo que consiste en CD27, OX40 (CD134) y 4-1BB (CD137).

35 Los anticuerpos biespecíficos (de longitud completa) pueden obtenerse enlazando covalente/químicamente dos anticuerpos (monoclonales) o mediante técnicas de hibridoma-híbrido convencionales. El enlace covalente de dos anticuerpos monoclonales se describe, por ejemplo, en Anderson (1992), Blood 80: 2826-34. En el contexto de esta enseñanza, uno de los anticuerpos es específico para el primer receptor de la superfamilia de TNF y el otro para el segundo receptor de la superfamilia de TNF.

40 Alternativamente, se pueden obtener anticuerpos biespecíficos (de longitud completa) utilizando la tecnología de botones en hojal, lo cual permite la heterodimerización de cadenas pesadas de anticuerpos mediante la introducción de mutaciones específicas en la interfaz del dímero CH3, por ejemplo, en la interfaz del dímero CH3 de IgG1 o IgG4. Esta tecnología se describe, por ejemplo, en Spiess C. et al. (2013), Journal of Biological Chemistry 288 (37): 26583-93; Labrijn A.F. et al. (2013), PNAS 110 (13): 5145-50; y WO 2008/119353 A1.

En una realización, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo biespecífico de cadena sencilla.

45 Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo biespecífico de cadena sencilla" denota una cadena de polipéptidos única que comprende dos dominios de unión. Cada dominio de unión comprende una región VH, en donde la región VH del primer dominio de unión se une específicamente al primer receptor de la superfamilia de TNF (REC1), y la región VH del segundo dominio de unión se une específicamente al segundo receptor de la superfamilia de TNF (REC2). Los dos dominios de unión están opcionalmente enlazados entre sí mediante un enlazador peptídico corto. Cada dominio de unión puede comprender adicionalmente una región variable de una cadena ligera de anticuerpos (VL), la región VH y la región VL dentro de cada uno de los dominios de unión primero y segundo se unen entre sí a través de un enlazador de péptido largo, que es lo suficientemente largo para permitir que la región VH y la región VL del primer dominio de unión y la región VH y la región VL del segundo dominio de unión se emparejen entre sí.

50 En una realización, las regiones de cadena pesada variable (VH) correspondientes y las regiones de cadena ligera variable (VL) correspondientes están dispuestas, desde el terminal N al terminal C, en el orden VH(REC1)-VL(REC1)-VH(REC2)-VL(REC2), VH(REC2)-VL(REC2)-VH(REC1)-VL(REC1) o VH(REC2)-VL(REC2)-VL(REC1)-VH(REC1). Sin embargo, también se prevé que los anticuerpos biespecíficos de cadena sencilla de la enseñanza comprendan otras disposiciones de dominio, tales como VL(REC1)-VH(REC1)-VH(REC2)-VL(REC2), VL(REC1)-VH(REC1)-

VL(REC2)-VH(REC2), VH(REC1)-VL(REC1)-VL(REC2)-VH(REC2), VL(REC2)-VH(REC2)-VH(REC1)-VL(REC1), VL(REC2)-VH(REC2)-VL(REC1)-VH(REC1).

Los enlazadores peptídicos generalmente están diseñados para proporcionar flexibilidad y resistencia a la proteasa. En una realización, el conector peptídico es un enlazador rico en glicina-serina-treonina o enlazador rico en glicina-serina, en donde al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, incluso más preferiblemente al menos el 90% de los aminoácidos son un residuo de glicina o serina o treonina o un residuo de glicina o serina, respectivamente. En otra realización, los aminoácidos se seleccionan de glicina, serina y treonina, es decir, el enlazador peptídico está compuesto exclusivamente por residuos de glicina, serina y treonina (denominado como un enlazador de glicina-serina-treonina). En aún otra realización, el enlazador peptídico está compuesto exclusivamente por residuos de glicina y serina (denominado como un enlazador de glicina-serina). Los enlazadores de péptidos cortos pueden consistir en 12 o menos, tales como 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 aminoácidos, y preferiblemente, 5 o 6 aminoácidos. Los enlazadores peptídicos cortos comprenden preferiblemente las secuencias de aminoácidos SGGGGS o GGGGS. Los enlazadores de péptidos largos pueden consistir en 12 o más, tales como 15 a 25 o 15 a 20 o 15 a 18 aminoácidos, y pueden, por ejemplo, seleccionarse de (GGGGS)₃, (GGGGS)₄ y (GGGGS)₅.

En una realización, el agente de unión de la enseñanza está en el formato de un fragmento de anticuerpo biespecífico.

El agente de unión de acuerdo con la enseñanza puede ser uno de diversos tipos de fragmentos variables bivalentes y trivalentes de cadena sencilla (scFv), proteínas de fusión que imitan los dominios variables de dos anticuerpos. Un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) de inmunoglobulinas, conectadas con un enlazador peptídico de diez a aproximadamente 25 aminoácidos. El enlazador peptídico usualmente es rico en glicina para flexibilidad, así como serina o treonina para solubilidad, y puede conectar bien sea el terminal N del VH con el terminal C del VL o viceversa. Los fragmentos variables divalentes (o bivalentes) de cadena sencilla (di-scFvs, bi-scFvs) se pueden modificar genéticamente enlazando dos scFvs. Esto se puede hacer produciendo una cadena peptídica sencilla con dos regiones VH y dos regiones VL, produciendo scFvs en tándem. La enseñanza también incluye moléculas multiespecíficas que comprenden más de dos dominios de unión a scFv. Esto hace posible que la molécula comprenda múltiples especificidades de antígeno y sea una molécula trispecífica, tetraspecífica o multiespecífica, o que la molécula sea una molécula biespecífica que comprenda más de un dominio de unión scFv con especificidad para el mismo antígeno. En particular, la molécula de la enseñanza puede ser un Fv de cadena sencilla multiespecífico.

En una realización, el agente de unión comprende dos regiones Fab, una dirigida contra el primer receptor de la superfamilia de TNF y la otra dirigida contra el segundo receptor de la superfamilia de TNF. En una realización, el agente de unión es un complejo de fragmento de unión a antígeno (Fab)₂. El complejo (Fab)₂ está compuesto por dos fragmentos Fab, un fragmento Fab que comprende un dominio Fv, es decir, dominios VH y VL, que se une al primer receptor de la superfamilia de TNF, y el otro fragmento Fab que comprende un dominio Fv que se une al segundo receptor de la superfamilia de TNF. Cada uno de los fragmentos Fab puede estar compuesto por dos cadenas simples, un módulo VL-CL y un módulo VH-CH. Alternativamente, cada uno de los fragmentos Fab individuales puede disponerse en una cadena sencilla, preferiblemente, VL-CL-CH-VH, y los dominios variables y constantes individuales pueden conectarse con un enlazador peptídico. En general, las cadenas sencillas individuales y los fragmentos Fab se pueden conectar a través de enlaces disulfuro, dominios adhesivos, enlaces químicos y/o enlaces de péptidos. El agente de unión también puede comprender más de dos fragmentos Fab, en particular, la molécula puede ser un Fab₃, Fab₄ o un complejo Fab multimérico con especificidad para 2, 3, 4 o más antígenos diferentes. La enseñanza también incluye Fabs elazados químicamente.

Otra posibilidad es la creación de scFvs con enlaces peptídicos que son demasiado cortos para que las dos regiones variables se plieguen (aproximadamente cinco aminoácidos), lo que obliga a los scFv a dimerizarse. Este tipo se conoce como diacuerpos. Los enlazadores peptídicos aún más cortos (uno o dos aminoácidos) conducen a la formación de trímeros, llamados triacuerpos o tricuerpos. También se han producido tetrauerpos. Exhiben una afinidad aún mayor por sus objetivos que los diacuerpos.

Un diacuerpo (Kipriyanov, *Int. J. Cancer* 77 (1998), 763-772) es un pequeño fragmento de anticuerpo bivalente y biespecífico. Los diacuerpos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptidos (VH-VL) conectado por un enlazador peptídico que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Esto fuerza el emparejamiento con los dominios complementarios de otra cadena y promueve el ensamblaje de una molécula dimerica con dos sitios de unión a antígeno funcionales. Para construir diacuerpos biespecíficos de la enseñanza, los dominios V de un anticuerpo que se une al primer receptor de la superfamilia de TNF (REC1) y un anticuerpo que se une al segundo receptor de la superfamilia de TNF (REC2) pueden fusionarse para crear las dos cadenas VH(REC1)-VL(REC2) y VH(REC2)-VL(REC1). Cada cadena por sí sola no puede unirse al antígeno respectivo, pero recrea los sitios de unión a antígeno funcionales de un anticuerpo anti-REC1 y un anticuerpo anti-REC2 al emparejarse con la otra cadena. Para este fin, se utiliza un enlazador peptídico que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Las dos moléculas scFv, con un enlazador entre el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera que es demasiado corto para la dimerización intramolecular, se

coexpresan y se autoensamblan para formar moléculas bi-específicas con los dos sitios de unión en los extremos opuestos.

5 En una realización, el fragmento de anticuerpo biespecífico que se une al primer receptor de la superfamilia de TNF (REC1) y el segundo receptor de la superfamilia de TNF (REC2) es un minicuerpo, preferiblemente, un minicuerpo que comprende dos cadenas VH-VL-C sencillas que son conectadas entre sí a través del dominio constante (C) de cada cadena. De acuerdo con este aspecto, las regiones de cadena pesada variable (VH) correspondientes, las regiones de cadena ligera variable (VL) correspondientes y los dominios constantes (C) están dispuestos, desde el terminal N al terminal C, en el orden VH(REC1)-VL(REC1)-(C) y VH(REC2)-VL(REC2)-C, en donde C es preferiblemente un dominio CH3. El emparejamiento de los dominios constantes da como resultado la formación del minicuerpo.

En una realización, el agente de unión biespecífico está en el formato de una molécula similar a un anticuerpo con una cadena pesada que contiene dos dominios variables N-terminales consecutivos con diferentes especificidades y una cadena ligera con dos dominios variables consecutivos con diferentes especificidades que dan como resultado cuatro dominios de unión con dos especificidades diferentes (Wu et al. (2007), Nat. Biotechnology 25 (11))

15 Los agentes de unión de acuerdo con la enseñanza también pueden comprender una secuencia de aminoácidos para facilitar la secreción de la molécula, tal como una señal de secreción N-terminal, y/o uno o más marcadores o etiquetas que facilitan la unión, purificación o detección de la molécula.

Preferiblemente, la señal de secreción es una secuencia de señal que permite un paso suficiente a través de la ruta secretora y/o la secreción del agente de unión en el entorno extracelular. Preferiblemente, la secuencia de señal de secreción es escindible y se elimina del agente de unión maduro. La secuencia de señal de secreción se selecciona preferiblemente con respecto a la célula u organismo en donde se produce el agente de unión.

20 Un "marcador o etiqueta que facilita la unión, purificación o detección de la molécula" pretende incluir cualquier marcador/etiquetas conocidas en la técnica para estos fines. Particularmente preferidos son las etiquetas de afinidad, tales como la proteína de unión a quitina (CBP), la proteína de unión a maltosa (MBP), la glutatión-S-transferasa (GST) y la poli(His) (por ejemplo, His₆); etiquetas de solubilización, tales como tiorredoxina (TRX) y poli(NANP); etiquetas de cromatografía, tales como una etiqueta FLAG; etiquetas de epítipo, tales como etiqueta V5, etiqueta myc y etiqueta HA; y marcadores o etiquetas fluorescentes o luminiscentes, tales como proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP, YFP, RFP, etc.), tintes fluorescentes y luciferasa.

30 La secuencia de aminoácidos de un marcador o etiqueta de(poli) péptido puede introducirse en cualquier posición dentro de la secuencia de aminoácidos del agente de unión, y puede, por ejemplo, tomar la forma de un bucle dentro de la estructura de proteína codificada o puede estar N-terminalmente o C-terminalmente fusionado. El marcador o etiqueta puede contener además un sitio de escisión que permite la eliminación del marcador o etiqueta del agente de unión. De manera similar, los marcadores o etiquetas no peptídicas, por ejemplo, colorantes fluorescentes, pueden conjugarse con el agente de unión en cualquier sitio adecuado.

35 Los agentes de unión de la enseñanza pueden contener, por ejemplo, además de dicho primer y segundo dominio de unión, un dominio de unión adicional que sirve, por ejemplo para mejorar la selectividad para un tipo de célula específico. Esto se puede lograr, por ejemplo, proporcionando un dominio de unión que se una a otro antígeno expresado en dicho tipo de célula específico.

40 Los agentes de unión de la enseñanza pueden comprender además una o más modificaciones que aumentan la estabilidad del agente de unión. El término "estabilidad" del agente de unión se refiere a la "vida media" del agente de unión, por ejemplo, in vivo. La "vida media" se refiere al período de tiempo que se necesita para eliminar la mitad de la actividad, cantidad o número de moléculas.

45 El agente de unión puede, por ejemplo, conjugarse con un módulo de extensión de vida media. Tales módulos son conocidos por una persona experta en la técnica e incluyen, por ejemplo, albúmina, un dominio de unión a albúmina, un dominio de unión a inmunoglobulina, un motivo de unión a FcRn y, en particular, un polímero. Los polímeros particularmente preferidos incluyen polietilenglicol (PEG), almidón de hidroxietilo (HES), ácido polisálico y secuencias de péptidos miméticos de PEG.

50 Los agentes de unión descritos en el presente documento pueden conjugarse con una unidad estructural o agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o un radioisótopo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial y, en particular, mate las células. Ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos adecuados para formar conjugados incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalancilo, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomannitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente

daunomicina) y doxorubicina) antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). En una realización preferida, el agente terapéutico es un agente citotóxico o un agente radiotóxico. En otra realización, el agente terapéutico es un inmunosupresor. En aún otra realización, el agente terapéutico es GM-CSF. En una realización preferida, el agente terapéutico es doxorubicina, cisplatino, bleomicina, sulfato, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida o ricina A.

Los agentes de unión también se pueden conjugar con un radioisótopo, por ejemplo, yodo 131, itrio 90 o indio 111, para generar radiofármacos citotóxicos.

Las técnicas para conjugar tal unidad estructural terapéutica con agentes de unión, tales como anticuerpos o fragmentos de los mismos, son bien conocidos, véase, por ejemplo, Aron et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

La presente enseñanza proporciona un agente de unión que comprende al menos dos dominios de unión, en donde un primer dominio de unión se une a un primer receptor de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y un segundo dominio de unión se une a un segundo receptor de la superfamilia de TNF, en donde el primer receptor y el segundo receptor son diferentes.

En una realización, el primer dominio de unión se une a CD40 y el segundo dominio de unión se une a CD27, en donde, preferiblemente, el agente de unión comprende

uno o más CDR o uno o más dominios variables del anticuerpo AB40_1, y

uno o más CDR o uno o más dominios variables de un anticuerpo AB27_X, en donde X se selecciona del grupo que consiste en 1 a 186, como se muestra en la Tabla 7.

"AB40_1" se refiere a un anticuerpo que se une a CD40, que comprende

(a) regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2323, HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2324 y HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2325, y

regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2326, LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2327 y LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2328; y

(b) dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2321 y dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2322.

En diversas realizaciones, el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 1; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 2; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 3; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 4; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 5; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 6; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 7; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 8; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 9; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 10; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 11; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 12; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 13; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 14; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 15; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 16; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 17; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 18; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 19; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 20; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de

- 5 anticuerpo AB40_1 y X es 88; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 89; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 90; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 91; o el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 92.
- En una realización, el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables del anticuerpo AB40_1 y X es 3. En otra realización, el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables del anticuerpo AB40_1 y X es 81)
- 10 En una realización, el primer dominio de unión se une a CD40 y el segundo dominio de unión se une a 4-1BB (CD137), en el que, preferiblemente, el agente de unión comprende
- una o más CDR o uno o más dominios variables del anticuerpo AB40_1, como se definió anteriormente, y una o más CDR o uno o más dominios variables de un anticuerpo AB137_X, en el que X se selecciona del grupo que consiste de 1 a 12, como se muestra en Tabla 9.
- 15 En diversas realizaciones, el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 1; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 2; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 3; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 4; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 5; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 6; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 7; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 8; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 9; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 10; el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 11; o el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables de anticuerpo AB40_1 y X es 12.
- 20 En una realización, el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables del anticuerpo AB40_1 y X es 2. En otra realización, el agente de unión comprende una o más CDR o uno o más dominios variables del anticuerpo AB40_1 y X es 12)
- 30 En una realización, el primer dominio de unión se une a 4-1BB (CD137) y el segundo dominio de unión se une a CD27, en donde, preferiblemente, el agente de unión comprende
- uno o más CDR o uno o más dominios variables de un anticuerpo AB137_X, en el que X se selecciona del grupo que consiste en 1 a 12, como se muestra en la Tabla 9, y
- 35 uno o más CDR o uno o más dominios variables de un anticuerpo AB27_Y, en el que Y se selecciona del grupo que consiste en 1 a 186, como se muestra en la Tabla 7.
- En diversas realizaciones, X es 1 y Y se selecciona del grupo que consiste en 1 a 186; X es 2 y Y se selecciona del grupo que consiste en 1 a 186; X es 3 y Y se selecciona del grupo que consiste en 1 a 186; X es 4 y Y se selecciona del grupo que consiste de 1 a 186; X es 5 y Y se selecciona del grupo que consiste en 1 a 186; X es 6 y Y se selecciona del grupo que consiste en 1 a 186; X es 7 y Y se selecciona del grupo que consiste en 1 a 186; X es 8 y Y se selecciona del grupo que consiste en 1 a 186; X es 9 y Y se selecciona del grupo que consiste en 1 a 186; X es 10 y Y se selecciona del grupo que consiste en 1 a 186; X es 11 y Y se selecciona del grupo que consiste en 1 a 186; o X es 12 y Y se selecciona del grupo que consiste en 1 a 186.
- 40 En diversas realizaciones,
- 45 X es 1 y Y es 1; X es 1 y Y es 2; X es 1 y Y es 3; X es 1 y Y es 4; X es 1 y Y es 5; X es 1 y Y es 6; X es 1 y Y es 7; X es 1 y Y es 8; X es 1 y Y es 9; X es 1 y Y es 10; X es 1 y Y es 11; X es 1 y Y es 12; X es 1 y Y es 13; X es 1 y Y es 14; X es 1 y Y es 15; X es 1 y Y es 16; X es 1 y Y es 17; X es 1 y Y es 18; X es 1 y Y es 19; X es 1 y Y es 20; X es 1 y Y es 21; X es 1 y Y es 22; X es 1 y Y es 23; X es 1 y Y es 24; X es 1 y Y es 25; X es 1 y Y es 26; X es 1 y Y es 27; X es 1 y Y es 28; X es 1 y Y es 29; X es 1 y Y es 30; X es 1 y Y es 31; X es 1 y Y es 32; X es 1 y Y es 33; X es 1 y Y es 34; X es 1 y Y es 35; X es 1 y Y es 36; X es 1 y Y es 37; X es 1 y Y es 38; X es 1 y Y es 39; X es 1 y Y es 40; X es 1 y Y es 41; X es 1 y Y es 42; X es 1 y Y es 43; X es 1 y Y es 44; X es 1 y Y es 45; X es 1 y Y es 46; X es 1 y Y es 47; X es 1 y Y es 48; X es 1 y Y es 49; X es 1 y Y es 50; X es 1 y Y es 51; X es 1 y Y es 52; X es 1 y Y es 53; X es 1 y Y es 54; X es 1 y Y es 55; X es 1 y Y es 56; X es 1 y Y es 57; X es 1 y Y es 58; X es 1 y Y es 59; X es 1 y Y es 60; X es 1 y Y es 61; X es 1 y Y es 62; X es 1 y Y es 63; X es 1 y Y es 64; X es 1 y Y es 65; X es 1 y Y es 66; X es 1 y Y es 67; X es 1 y Y es 68; X es 1 y Y es 69; X es 1 y Y es 70; X es 1 y Y es 71; X es 1 y Y es 72; X es 1 y Y es 73; X es 1 y Y es 74; X es 1 y Y es 75; X es 1 y Y es 76; X es 1 y Y es 77; X es 1 y Y es 78; X es 1 y Y es 79; X es 1 y Y es 80; X es 1 y Y es 81; X es 1 y Y es 82; X es 1 y Y es 83; X es 1 y Y es 84; X es 1 y Y es 85; X es 1 y Y es 86; X es 1 y Y es 87; X es 1 y Y es 88; X es 1 y Y es 89; X es 1 y Y es 90; X es 1 y Y es 91; X es 1 y Y es 92; X es 1 y Y es 93; X es 1 y Y es 94;
- 50
- 55

X es 92 y Y es 76; X es 92 y Y es 77; X es 92 y Y es 78; X es 92 y Y es 79; X es 92 y Y es 80; X es 92 y Y es 81; X es 92 y Y es 82; X es 92 y Y es 83; X es 92 y Y es 84; X es 92 y Y es 85; X es 92 y Y es 86; X es 92 y Y es 87; X es 92 y Y es 88; X es 92 y Y es 89; X es 92 y Y es 90; X es 92 y Y es 91; X es 92 y Y es 92; X es 92 y Y es 93; X es 92 y Y es 94; X es 92 y Y es 95; X es 92 y Y es 96; X es 92 y Y es 97; X es 92 y Y es 98; X es 92 y Y es 99; X es 92 y Y es 100; X es 92 y Y es 101; X es 92 y Y es 102; X es 92 y Y es 103; X es 92 y Y es 104; X es 92 y Y es 105; X es 92 y Y es 106; X es 92 y Y es 107; X es 92 y Y es 108; X es 92 y Y es 109; X es 92 y Y es 110; X es 92 y Y es 111; X es 92 y Y es 112; X es 92 y Y es 113; X es 92 y Y es 114; X es 92 y Y es 115; X es 92 y Y es 116; X es 92 y Y es 117; X es 92 y Y es 118; X es 92 y Y es 119; X es 92 y Y es 120; X es 92 y Y es 121; X es 92 y Y es 122; X es 92 y Y es 123; X es 92 y Y es 124; X es 92 y Y es 125; X es 92 y Y es 126; X es 92 y Y es 127; X es 92 y Y es 128; X es 92 y Y es 129; X es 92 y Y es 130; X es 92 y Y es 131; X es 92 y Y es 132; X es 92 y Y es 133; X es 92 y Y es 134; X es 92 y Y es 135; X es 92 y Y es 136; X es 92 y Y es 137; X es 92 y Y es 138; X es 92 y Y es 139; X es 92 y Y es 140; X es 92 y Y es 141; X es 92 y Y es 142; X es 92 y Y es 143; X es 92 y Y es 144; X es 92 y Y es 145; X es 92 y Y es 146; X es 92 y Y es 147; X es 92 y Y es 148; X es 92 y Y es 149; X es 92 y Y es 150; X es 92 y Y es 151; X es 92 y Y es 152; X es 92 y Y es 153; X es 92 y Y es 154; X es 92 y Y es 155; X es 92 y Y es 156; X es 92 y Y es 157; X es 92 y Y es 158; X es 92 y Y es 159; X es 92 y Y es 160; X es 92 y Y es 161; X es 92 y Y es 162; X es 92 y Y es 163; X es 92 y Y es 164; X es 92 y Y es 165; X es 92 y Y es 166; X es 92 y Y es 167; X es 92 y Y es 168; X es 92 y Y es 169; X es 92 y Y es 170; X es 92 y Y es 171; X es 92 y Y es 172; X es 92 y Y es 173; X es 92 y Y es 174; X es 92 y Y es 175; X es 92 y Y es 176; X es 92 y Y es 177; X es 92 y Y es 178; X es 92 y Y es 179; X es 92 y Y es 180; X es 92 y Y es 181; X es 92 y Y es 182; X es 92 y Y es 183; X es 92 y Y es 184; X es 92 y Y es 185; o X es 92 y Y es 186.

20 En una realización, X es 3 y Y es 5.

El término "una o más CDR", como se usa en conexión con las realizaciones anteriores, se refiere a una de las CDR HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 (por ejemplo, HCDR3), o varias (es decir, 2, 3, 4, 5 o 6) de las CDR, tal como un conjunto de HCDR1, HCDR2 y HCDR3 o un conjunto de LCDR1, LCDR2 y LCDR3. En una realización preferida, el término "una o más CDR" se refiere a las seis CDR, es decir, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3.

El término "uno o más dominios variables", como se usa en conexión con las realizaciones anteriores, se refiere preferiblemente a uno del dominio VH y al dominio VL o, más preferiblemente, tanto al dominio VH como al dominio VL.

El término "molécula de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, pretende incluir ADN y ARN, tales como ADN genómico, ADNc, ARNm, moléculas producidas recombinantemente y sintetizadas químicamente. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria. El ARN incluye ARN transcrito in vitro (ARN IVT) o ARN sintético.

En el contexto de la presente enseñanza, el término "ADN" se refiere a una molécula que comprende residuos de desoxirribonucleótidos y preferiblemente está compuesta total o sustancialmente de residuos de desoxirribonucleótidos. "Desoxirribonucleótido" se refiere a un nucleótido que carece de un grupo hidroxilo en la posición 2' de un grupo β -D-ribofuranosilo. El término "ADN" comprende ADN aislado tal como ADN purificado parcial o completamente, ADN esencialmente puro, ADN sintético y ADN generado de forma recombinante e incluye ADN modificado que difiere del ADN de origen natural mediante adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Tales alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como los extremos de un ADN o internamente, por ejemplo en uno o más nucleótidos del ADN. Los nucleótidos en las moléculas de ADN también pueden comprender nucleótidos no estándar, tales como nucleótidos que no se producen naturalmente o nucleótidos sintetizados químicamente. Estos ADN alterados pueden denominarse análogos o análogos de ADN de origen natural.

En el contexto de la presente enseñanza, el término "ARN" se refiere a una molécula que comprende residuos de ribonucleótidos y preferiblemente está compuesta total o sustancialmente de residuos de ribonucleótidos. "Ribonucleótido" se refiere a un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un grupo β -D-ribofuranosilo. El término incluye ARN bicatenario, ARN monocatenario, ARN aislado tal como ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido de forma recombinante, así como ARN modificado que difiere del ARN natural por la adición, eliminación, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Tales alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como los extremos de un ARN o internamente, por ejemplo en uno o más nucleótidos del ARN. Los nucleótidos en las moléculas de ARN también pueden comprender nucleótidos no estándar, tales como nucleótidos de origen no natural o nucleótidos o desoxinucleótidos sintetizados químicamente. Estos ARN alterados pueden denominarse análogos o análogos de ARN de origen natural. De acuerdo con la presente enseñanza, el término "ARN" incluye y preferiblemente se refiere a "ARNm" que significa "ARN mensajero" y se refiere a una transcripción que puede producirse usando ADN como plantilla y codifica un péptido o proteína. El ARNm típicamente comprende una región no traducida en 5' (5'-UTR), una región codificante de proteínas o péptidos y una región no traducida en 3' (3'-UTR). El ARNm tiene una vida media limitada en las células e in vitro. Preferiblemente, el ARNm se produce por transcripción in vitro usando una plantilla de ADN. En una realización de la enseñanza, el ARN se obtiene por transcripción in vitro o síntesis química. La metodología de transcripción in vitro es conocida por la persona experta. Por ejemplo, hay una variedad de kits de transcripción in vitro disponibles comercialmente.

La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente enseñanza puede estar contenida/comprendida en un vector. El término "vector", como se usa en el presente documento, incluye cualquier vector conocido por la persona experta, incluidos vectores plasmídicos, vectores cósmidos, vectores fagos, tales como fagos lambda, vectores virales, tales como vectores adenovirales o baculovirales, o vectores cromosómicos artificiales tales como cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC) o cromosomas artificiales P1 (PAC). Dichos vectores incluyen expresión así como vectores de clonación. Los vectores de expresión comprenden plásmidos así como vectores virales y generalmente contienen una secuencia de codificación deseada y secuencias de ADN apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia de codificación operativamente enlazada en un organismo huésped particular (por ejemplo, bacterias, levaduras, plantas, insectos o mamíferos) o en sistemas de expresión in vitro. Los vectores de clonación se usan generalmente para modificar por ingeniería genética y amplificar un cierto fragmento de ADN deseado y pueden carecer de secuencias funcionales necesarias para la expresión de los fragmentos de ADN deseados.

El término "célula" o "célula huésped" se refiere preferiblemente a una célula intacta, es decir, una célula con una membrana intacta que no ha liberado sus componentes intracelulares normales tales como enzimas, orgánulos o material genético. Una célula intacta es preferiblemente una célula viable, es decir, una célula viva capaz de llevar a cabo sus funciones metabólicas normales. Preferiblemente, dicho término se refiere de acuerdo con las enseñanzas a cualquier célula que pueda transfectarse con un ácido nucleico exógeno. Preferiblemente, la célula cuando se transfecta con un ácido nucleico exógeno y se transfiere a un receptor puede expresar el ácido nucleico en el receptor. El término "célula" incluye células bacterianas; otras células útiles son células de levadura, células fúngicas o células de mamífero. Células bacterianas adecuadas incluyen células de cepas bacterianas gram-negativas tales como cepas de *Escherichia coli*, *Proteus* y *Pseudomonas*, y cepas bacterianas gram-positivas tales como cepas de *Bacillus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus* y *Lactococcus*. Células fúngicas adecuadas incluyen células de especies de *Trichoderma*, *Neurospora* y *Aspergillus*. Células de levadura adecuadas incluyen células de especies de *Saccharomyces* (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (por ejemplo *Schizosaccharomyces pombe*), *Pichia* (por ejemplo *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*) y *Hansenula*. Células de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, células CHO, células BHK, células HeLa, células COS, 293 HEK y similares. Sin embargo, también pueden usarse células de anfibios, células de insectos, células vegetales y cualquier otra célula usada en la técnica para la expresión de proteínas heterólogas. Las células de mamíferos son particularmente preferidas para la transferencia adoptiva, tal como las células de humanos, ratones, hámsteres, cerdos, cabras y primates. Las células pueden derivarse de una gran cantidad de tipos de tejidos e incluyen células primarias y líneas celulares tales como células del sistema inmunitario, en particular células presentadoras de antígeno (APC), tales como células dendríticas y células T, células madre, tales como células madre hematopoyéticas y células madre mesenquimales, y otros tipos de células. Una célula presentadora de antígeno es una célula que muestra antígeno en el contexto de un complejo de histocompatibilidad importante en su superficie. Las células T pueden reconocer este complejo utilizando su receptor de células T (TCR).

Los agentes de unión de la enseñanza pueden producirse intracelularmente (por ejemplo, en el citosol, en el periplasma o en cuerpos de inclusión) y luego aislarse de las células huésped y opcionalmente purificarse adicionalmente; o pueden producirse extracelularmente (por ejemplo, en el medio en el que se cultivan las células huésped) y luego aislarse del medio de cultivo y opcionalmente purificarse adicionalmente. Los métodos y reactivos utilizados para la producción recombinante de polipéptidos, tales como vectores de expresión adecuados específicos, métodos de transformación o transfección, marcadores de selección, métodos de inducción de expresión de proteínas, condiciones de cultivo y similares, son conocidos en la técnica. Del mismo modo, las personas expertas conocen bien las técnicas de aislamiento y purificación de proteínas.

Los agentes de unión, las moléculas de ácido nucleico o las células descritas en el presente documento pueden administrarse en forma de cualquier composición farmacéutica adecuada.

Las composiciones farmacéuticas de la enseñanza son preferiblemente estériles y contienen una cantidad efectiva de los agentes de unión, moléculas de ácido nucleico o células descritas en el presente documento para generar la reacción deseada o el efecto deseado.

Las composiciones farmacéuticas usualmente se proporcionan en una forma de dosificación uniforme y se pueden preparar de una manera conocida per se. Una composición farmacéutica puede, por ejemplo, estar en forma de una solución o suspensión.

Una composición farmacéutica puede comprender además uno o más portadores y/o excipientes, todos los cuales son preferiblemente farmacéuticamente aceptables. El término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a la no toxicidad de un material que, preferiblemente, no interactúa con la acción del agente activo de la composición farmacéutica.

El término "portador" se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de naturaleza natural o sintética, en el que el componente activo se combina con el fin de facilitar, mejorar o permitir la aplicación. De acuerdo con las enseñanzas, el término "portador" también incluye uno o más agentes de relleno sólidos o líquidos compatibles, diluyentes o sustancias encapsulantes, que son adecuados para la administración a un sujeto.

Las posibles sustancias portadoras para la administración parenteral son, por ejemplo, agua estéril, Ringer, lactato de Ringer, solución de cloruro de sodio estéril, polialquilenglicoles, naftalenos hidrogenados y, en particular, polímeros de lactida biocompatibles, copolímeros de lactida/glicólido o copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno.

5 El término "excipiente", como se usa en el presente documento, pretende incluir todas las sustancias que pueden estar presentes en una composición farmacéutica y que no son ingredientes activos, tales como sales, de unión, lubricantes, espesantes, agentes con actividad de superficie, conservantes, emulsionantes, sustancias reguladoras, aromatizantes o colorantes.

10 Las sales, que no son farmacéuticamente aceptables, se pueden usar para preparar sales farmacéuticamente aceptables y se incluyen en la enseñanza. Las sales farmacéuticamente aceptables de este tipo comprenden de manera no limitativa las preparadas a partir de los siguientes ácidos: ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables también se pueden preparar como sales de metales alcalinos o sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de sodio, sales de potasio o sales de calcio.

15 Los conservantes adecuados para uso en una composición farmacéutica incluyen cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabeno y timerosal.

Las sustancias reguladoras adecuadas para uso en una composición farmacéutica incluyen ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal.

20 Los agentes y composiciones descritos en el presente documento pueden administrarse por cualquier ruta convencional, tal como por administración parenteral, incluyendo inyección o infusión. La administración es preferiblemente parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, intradérmica o intramuscular.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral usualmente comprenden una preparación acuosa o no acuosa estéril del compuesto activo, que es preferiblemente isotónica para la sangre del receptor. Ejemplos de portadores/solventes/diluyentes compatibles son la solución Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, usualmente se utilizan aceites fijos estériles como solución o medio de suspensión.

25 Los agentes y composiciones descritos en este documento se administran en cantidades efectivas. Una "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad, que logra una reacción deseada o un efecto deseado solo o junto con otras dosis. En el caso del tratamiento de una enfermedad particular o de una condición particular, la reacción deseada se refiere preferiblemente a la inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende ralentizar el progreso de la enfermedad y, en particular, interrumpir o revertir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad o de una condición también puede ser la demora del inicio o la prevención del inicio de dicha enfermedad o condición. Una cantidad efectiva de un agente o composición descrita en este documento dependerá de la condición que se va a tratar, la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente, incluida la edad, condición fisiológica, tamaño y peso, la duración del tratamiento, el tipo de una terapia de acompañamiento (si está presente), la ruta específica de administración y factores similares. Por consiguiente, las dosis administradas de los agentes descritos en el presente documento pueden depender de diversos de tales parámetros. En el caso de que una reacción en un paciente sea insuficiente con una dosis inicial, se pueden usar dosis más altas (o efectivamente dosis más altas logradas por una ruta de administración diferente y más localizada).

40 Como se usa en el presente documento, el término "kit de partes (en resumen: kit)" se refiere a un artículo de fabricación que comprende uno o más contenedores y, opcionalmente, un portador de datos. Dichos uno o más contenedores pueden llenarse con uno o más de los medios o reactivos mencionados anteriormente. Se pueden incluir recipientes adicionales en el kit que contienen, por ejemplo, diluyentes, reguladores y reactivos adicionales. Dicho portador de datos puede ser un portador de datos no electrónico, por ejemplo, un portador de datos gráficos tal como un folleto informativo, una hoja de información, un código de barras o un código de acceso, o un portador de datos electrónico tal como un disquete, un disco compacto (CD), un disco digital versátil (DVD), un microchip u otro portador de datos electrónicos con base en semiconductores. El código de acceso puede permitir el acceso a una base de datos, por ejemplo, una base de datos de Internet, una base de datos centralizada o descentralizada. Dicho portador de datos puede comprender instrucciones para el uso del agente de unión, molécula de ácido nucleico, composición celular y/o farmacéutica de la presente enseñanza.

50 Los agentes y composiciones descritos en este documento pueden administrarse a pacientes, por ejemplo, in vivo, para tratar o prevenir una variedad de trastornos tales como los descritos en este documento.

El término "medicamento", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia/composición usada en terapia, es decir, en el tratamiento de una enfermedad.

55 De acuerdo con la enseñanza, el término "enfermedad" se refiere a cualquier estado patológico, en particular cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, trastornos autoinmunes, enfermedades degenerativas, enfermedades asociadas con la apoptosis y rechazos de trasplantes.

Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" incluye una enfermedad caracterizada por un crecimiento, proliferación, diferenciación, adhesión y/o migración celular regulado de manera aberrante. Por "célula cancerosa" se entiende una célula anormal que crece mediante una proliferación celular rápida e incontrolada y continúa creciendo después de que cesan los estímulos que iniciaron el nuevo crecimiento. El término "cáncer" de acuerdo con la enseñanza comprende leucemias, seminomas, melanomas, teratomas, linfomas, neuroblastomas, gliomas, cáncer de recto, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer suprarrenal, cáncer de tiroides, cáncer de sangre, cáncer de piel, cáncer de cerebro, cáncer cervical, cáncer intestinal, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de intestino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de nodos linfáticos, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de oído, nariz y garganta (ENT), cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de ovario y cáncer de pulmón y metástasis de los mismos. Ejemplos de los mismos son carcinomas de pulmón, carcinomas de mama, carcinomas de próstata, carcinomas de colon, carcinomas de células renales, carcinomas cervicales o metástasis de los tipos de cáncer o tumores descritos anteriormente.

El término "cáncer" de acuerdo con la enseñanza también comprende metástasis de cáncer. Por "metástasis" se entiende la propagación de células cancerosas desde su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y depende del desprendimiento de células malignas del tumor primario, la invasión de la matriz extracelular, la penetración de las membranas basales endoteliales para ingresar en la cavidad corporal y los vasos, y luego, después de ser transportado por la sangre, infiltración de órganos objetivo. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor, es decir, un tumor secundario o tumor metastásico, en el sitio objetivo depende de la angiogénesis. La metástasis tumoral a menudo ocurre incluso después de la eliminación del tumor primario porque las células o componentes tumorales pueden permanecer y desarrollar potencial metastásico. En una realización, el término "metástasis" de acuerdo con la enseñanza se refiere a "metástasis distante" que se refiere a una metástasis que está alejada del tumor primario y del sistema de ganglios linfáticos regionales.

El término "enfermedad infecciosa" se refiere a cualquier enfermedad que puede transmitirse de individuo a individuo o de organismo a organismo, y es causada por un agente microbiano (por ejemplo, resfriado común). Ejemplos de enfermedades infecciosas incluyen enfermedades infecciosas virales, tales como SIDA (VIH), hepatitis A, B o C, herpes, herpes zoster (varicela), sarampión alemán (virus de la rubéola), fiebre amarilla, dengue, etc. flavivirus, virus de la influenza, enfermedades infecciosas hemorrágicas (virus de Marburg o Ébola) y síndrome respiratorio agudo severo (SRAS), enfermedades infecciosas bacterianas, tales como la enfermedad del Legionario (*Legionella*), enfermedades de transmisión sexual (por ejemplo, clamidia o gonorrea), úlcera gástrica (*Helicobacter*), cólera (*Vibrio*), tuberculosis, difteria, infecciones por *E. coli*, *Estafilococos*, *Salmonella* o estreptococos (tétanos); infecciones por patógenos de protozoos tales como malaria, enfermedad del sueño, leishmaniasis, toxoplasmosis, es decir, infecciones por *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Toxoplasma*; o infecciones fúngicas, que son causadas, por ejemplo, por *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* o *Candida albicans*.

El término "enfermedad inflamatoria" se refiere a cualquier enfermedad, que se caracteriza por o está asociada con altos niveles de inflamación en los tejidos, en particular los tejidos conectivos, o la degeneración de estos tejidos. Una enfermedad inflamatoria crónica es una condición médica que se caracteriza por inflamación persistente. Ejemplos de enfermedades inflamatorias (crónicas) incluyen enfermedad celíaca, vasculitis, lupus, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad del intestino irritable, aterosclerosis, artritis, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, colitis, hepatitis crónica activa, dermatitis y psoriasis.

El término "enfermedad metabólica" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno que interrumpe el metabolismo normal. Ejemplos incluyen cistinosis, diabetes, dislipidemia, hipertiroidismo, hipotiroidismo, hiperlipidemia, hipolipidemia, galactosemia, enfermedad de Gaucher, obesidad y fenilcetonuria.

El término "trastorno autoinmune" se refiere a cualquier enfermedad/trastorno en el que el cuerpo produce una respuesta inmunogénica (es decir, sistema inmunitario) a algún componente de su propio tejido. En otras palabras, el sistema inmune pierde su capacidad de reconocer algunos tejidos o sistemas dentro del cuerpo como propios y objetivos y lo ataca como si fuera extraño. Las enfermedades autoinmunes se pueden clasificar en aquellas en las que predomina un órgano afectado (por ejemplo, anemia hemolítica y tiroiditis antiinmune), y aquellas en las que el proceso de la enfermedad autoinmune se difunde a través de muchos tejidos (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico). Por ejemplo, se cree que la esclerosis múltiple es causada por las células T que atacan las vainas que rodean las fibras nerviosas del cerebro y la médula espinal. Esto da como resultado la pérdida de coordinación, debilidad y visión borrosa. Las enfermedades autoinmunes son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, lupus, esclerosis múltiple, artritis reumática, anemia hemolítica, tiroiditis antiinmune, lupus eritematoso sistémico, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colitis, diabetes, esclerodermia, psoriasis y similares.

El término "enfermedad degenerativa" se refiere a cualquier enfermedad en la cual la función o estructura de los tejidos u órganos afectados se deteriorará cada vez más con el tiempo. Ejemplos incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Huntington, la degeneración macular, la esclerosis múltiple, la distrofia muscular, la enfermedad de Niemann Pick, la osteoporosis y la artritis reumatoide.

El término "enfermedades asociadas a la apoptosis" se refiere a cualquier enfermedad en la que están involucradas alteraciones de la apoptosis. Ejemplos incluyen cáncer, trastornos neurológicos, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y apoplejía, enfermedades cardíacas, tales como reperfusión isquémica e insuficiencia cardíaca crónica, enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunes.

El término "rechazo de trasplante" se refiere al rechazo de un tejido u órgano trasplantado por el sistema inmune del receptor, que puede, en última instancia, destruir el tejido u órgano trasplantado.

Por "tratar" se entiende administrar un compuesto o composición o una combinación de compuestos o composiciones a un sujeto con el fin de prevenir o eliminar una enfermedad, incluyendo la reducción del tamaño de un tumor o el número de tumores en un sujeto; detener o retrasar una enfermedad en un sujeto; inhibir o retrasar el desarrollo de una nueva enfermedad en un sujeto; disminuir la frecuencia o severidad de los síntomas y/o recurrencias en un sujeto quien actualmente tiene o que previamente ha tenido una enfermedad; y/o prolongar, es decir, aumentar la vida útil del sujeto.

En particular, el término "tratamiento de una enfermedad" incluye curar, acortar la duración, mejorar, prevenir, ralentizar o inhibir la progresión o empeoramiento, o prevenir o retrasar la aparición de una enfermedad o sus síntomas.

El término "sujeto" significa, de acuerdo con las enseñanzas, un sujeto para tratamiento, en particular un sujeto enfermo (también denominado "paciente"), que incluye seres humanos, primates no humanos u otros animales, en particular mamíferos, tales como vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, conejos, conejillos de indias, hámsteres o roedores, tales como ratones y ratas. En una realización particularmente preferida, el sujeto/paciente es un ser humano.

Los agentes y composiciones proporcionados en el presente documento pueden usarse solos o en combinación con regímenes terapéuticos.

Ejemplos

Ejemplo 1: generación de anticuerpos anti-CD27, anti-CD134 y anti-CD137 agonistas

1.1 Inmunización y recolección de clones de células B

Se inmunizaron 9 conejos con una mezcla de CD27 humano (Enzo Life Sciences, ALX-522-031-0000), CD134 humano (OX40; AdipoGen, AG-40B-0014) y CD137 humano (4-1BB; Enzo Life Sciences, ALX-522-029-0000), en donde cada proteína se fusionó con la porción Fc de IgG1 humana. Se extrajo sangre en 4 puntos temporales diferentes y se enriqueció para linfocitos B (también denominados como células B). Las células B individuales se clasificaron mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) en pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos y se cultivaron durante 8 días, liberando anticuerpos en el medio de cultivo. Los sobrenadantes de células B se eliminaron y se prepararon para la prueba.

1.2 Criba para anticuerpos que se unen a objetivos por ELISA

Con el fin de identificar anticuerpos que se unen a CD27, CD134 y CD137 humanos, respectivamente, se estableció un ensayo de inmunosorción enzimática (ELISA). Para este propósito, proteína CD27 (etiquetada con His, Sino Biological Inc. 10039-H08B1), proteína CD134 (etiquetada con His, Sino Biological Inc. 10481-H08H) y proteína CD137 (etiquetada con His, Sino Biological Inc. 10041-H08H), respectivamente, se recubrieron sobre placas de microtitulación. Se usó PBS que contenía 2% de BSA y 0.05% de Tween para el bloqueo. Después de la incubación con sobrenadantes de células B, los anticuerpos unidos se detectaron usando un anticuerpo anti-conejo-Fc marcado con peroxidasa.

Los anticuerpos disponibles comercialmente se usaron como anticuerpos de referencia para el desarrollo del ensayo. La Figura 1A muestra curvas de unión de anticuerpos anti-CD27 de referencia (clon CD27 anti-humano monoclonal de hámster armenio LG7F9 y clon CD27 anti-humano monoclonal de ratón 0323, ambos adquiridos de eBiosciences) a proteína recombinante. La Figura 1B muestra curvas de unión de un anticuerpo anti-CD134 de referencia (clon CD134 monoclonal anti-humano de ratón Ber-ACT35, adquirido de eBiosciences) a proteína recombinante. La Figura 1C muestra curvas de unión de anticuerpos anti-CD137 de referencia (clon CD137 antihumano de ratón 4B4-1 de Biolegend y CD137 antihumano monoclonal de rata de Biozol BZL06614) a proteína recombinante. Para los tres ELISA, los valores de OD 450 nm/620 nm > 0.5 indicaron unión, y el valor máximo fue de aproximadamente 3.6.

En total, 47.471 células B se clasificaron, cultivaron y CRIBARON para su unión a CD27, CD134 y CD137 por ELISA. Se identificaron 5.096 anticuerpos para unirse al menos a uno de los tres objetivos.

1.3 Identificación de anticuerpos de unión celular

Los éxitos de 5.096 ELISA se probaron luego en un ensayo de unión celular para la unión a CD27, CD134 y CD137, respectivamente, expresados en la superficie celular. Para este propósito, se usaron los siguientes transfectantes estables de la línea celular HT1080: HT1080_CD27, HT1080-OX40 y HT1080_4-1BB. Las células se cultivaron en

RPMI 1640 GlutaMAX suplementado con 5% de FCS, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. La expresión de la superficie celular de los receptores de TNF en transfectantes HT1080 se analizó mediante FACS, en donde las células se tiñeron usando anticuerpos contra CD27-PE (BD), OX40-PE (BD) y 4-1BB-PE (BD) (Figura 2).

5 Con el fin de probar la unión celular de los anticuerpos, las células HT1080 que sobreexpresan el objetivo respectivo (1.000 células por pocillo de una placa de microtitulación de 384 pocillos) se incubaron junto con muestras durante 18 horas. Después de un lavado suave, se agregaron un anticuerpo de detección marcado con Alexa y un colorante Hoechst, y se leyó la intensidad de fluorescencia en el generador de imágenes de células CellInsight (Thermo). El análisis de los datos se basó en el cálculo de la intensidad promedio del punto medio del objeto.

10 Los anticuerpos disponibles comercialmente se usaron como anticuerpos de referencia para el desarrollo del ensayo. La Figura 3A muestra curvas de unión de anticuerpos anti-CD27 de referencia (clon CD27 anti-humano monoclonal de hámster armenio LG7F9) a células HT1080_CD27. La Figura 3B muestra curvas de unión de anticuerpos anti-CD 134 de referencia (clon CD134 anti-humano monoclonal de ratón Ber-ACT35) a células HT1080_OX40. La Figura 3C muestra curvas de unión de anticuerpos anti-CD137 de referencia (clon CD137 anti-humano de ratón 4B4-1) a células HT1080_4-1BB. Para las tres líneas celulares, una intensidad de punto media > 25 indicó unión, y los valores máximos fueron de aproximadamente 300.

3.176 anticuerpos de los 5.096 aciertos de ELISA se identificaron para unirse al menos a uno de los tres objetivos expresados en la superficie celular mediante el ensayo de unión celular.

1.4 Producción de anticuerpos recombinantes

20 Se seleccionaron 644 aciertos de anticuerpos, identificados por ELISA y el ensayo de unión celular como se describió anteriormente. Estos aciertos se recogieron, se extrajo su ARN y se realizó la secuenciación. Se identificaron 582 secuencias únicas y se sintetizaron las regiones variables correspondientes de cadenas pesadas y ligeras. Las regiones variables se clonaron frente a partes constantes de inmunoglobulina humana (IgG1/k). Los protocolos de transfecciones transitorias de células HEK293 fueron ejecutados por un dispositivo Tecan Freedom Evo en un Dionex Ultimate 3000 con un muestreador automático de placas. Después de la normalización, 531 anticuerpos estaban disponibles para la confirmación del conjunto de datos de cribado primario (ELISA, unión celular) y para ensayos funcionales.

1.5 Análisis de anticuerpos expresados recombinantemente

30 Con el fin de confirmar el conjunto de datos de cribado primario, todos los 531 anticuerpos producidos de forma recombinante se volvieron a analizar (i) para su unión a la proteína recombinante correspondiente en el ELISA y (ii) para su unión al objetivo correspondiente expresado en la superficie celular de las células HT1080 en el ensayo de unión celular (ambos ensayos como se describe anteriormente).

35 Adicionalmente, para el análisis de las funciones de anticuerpos agonistas, se usaron células HT1080 que sobreexpresan el objetivo, en donde la estimulación de los objetivos (CD27, CD134 y CD137, respectivamente) indujo la liberación de IL-8 desde estas líneas celulares. Las células HT1080 que sobreexpresan CD27, CD134 y CD137 recombinantes (5.000 células por pocillo de una placa de microtitulación de 384 pocillos) se incubaron durante 6 horas a 37°C con las muestras de anticuerpos. Las concentraciones de IL-8 en los sobrenadantes se determinaron utilizando un kit de ELISA IL-8 (BD Bioscience). En una segunda metodología, los anticuerpos estaban entrecruzados. Por lo tanto, las células HT1080 que sobreexpresan el objetivo se incubaron con una mezcla de la muestra de anticuerpo y una IgG anti-humana de cabra de fragmento F(ab')₂ (Dianova). Se usó un anticuerpo de referencia anti-CD27 agonista [descrito en el documento US 2013/0183316 A1 (secuencias 3 y 4, hCD27.15)] para el desarrollo del ensayo. La Figura 4 muestra los resultados del ELISA de IL-8 tras la titulación de anticuerpos con y sin entrecruzamiento. Para los tres ELISA de IL-8, los valores de OD 450 nm/620 nm > 0.5 indicaron actividades de anticuerpos agonistas, siendo los valores máximos de aproximadamente 3.

45 En total, 186 anticuerpos anti-CD27 agonistas, 92 anticuerpos anti-CD 134 agonistas y 12 anticuerpos anti-CD137 agonistas se identificaron mediante el ensayo funcional bajo condiciones de entrecruzamiento. Hasta cierto punto, los anticuerpos ya mostraron actividad agonista sin entrecruzamiento. Los datos de los ELISA, los ensayos de unión celular y los ensayos funcionales se resumen en la Tabla 1 para los anticuerpos anti-CD27 agonistas, en la Tabla 2 para los anticuerpos anti-CD134 agonistas y en la Tabla 3 para los anticuerpos anti-CD 137 agonistas.

50 Los valores de EC50 de la función agonista de anti-CD27, anti-CD134 y anti-CD137, respectivamente, tras el entrecruzamiento se determinaron mediante la medición de los valores de liberación de IL-8 de 12 concentraciones de anticuerpos diferentes aplicadas en el ensayo funcional descrito anteriormente. El valor de EC50 se calculó utilizando herramientas de análisis Xlfit (Fit Models 205). La progresión típica de la curva sigmoidea resultante se muestra a modo de ejemplo en la Figura 5 para un anticuerpo anti-CD27 (P018.S09.A.A06; EC50: 387,2 ng/ml), para un anticuerpo anti-CD134 (P018.S02.A.H03 ; EC50: 214,9 ng/mL) y para un anticuerpo anti-CD137 (P018.S08.A.E03; EC50: 4963,8 ng/mL). Los valores de EC50 de los anticuerpos se listan en la Tabla 4 (anti-CD27), la Tabla 5 (anti-CD134) y la Tabla 6 (anti-CD137).

La información de secuencia de los anticuerpos probados se lista en la Tabla 7 (anti-CD27), la Tabla 8 (anti-CD134) y la Tabla 9 (anti-CD137), en donde las secuencias de las regiones CDR se dan de acuerdo con el esquema de numeración única de IMGT esquema para dominios V y similares a V (Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999)).

5

Tabla 1. Propiedades de unión y actividad funcional de los anticuerpos agonistas anti-CD27:

ID de anticuerpo Anti-CD27	ELISA	Ensayo de unión celular	Ensayo funcional	
	[corr. abs.]	[RFU]	IL-8 [corr. abs.]	Entrecruzado por IL-8 de fragmento F(ab') ₂ [corr. abs.]
P018.S.01.A.G04	3,765	388	0,273	1,145
P018.S.04.A.D04	3,696	365	0,486	1,322
P018.S.01.A.G02	3,673	363	0,848	1,878
P018.S.07.A.B04	3,635	382	0,304	1,667
P018.S.06.A.B03	3,594	424	0,566	1,220
P018.S.03.A.H04	3,589	334	0,211	1,226
P018.S.08.A.H02	3,576	352	0,328	1,909
P018.S.09.A.H03	3,536	268	0,578	2,130
P018.S.09.A.E06	3,535	307	1,228	1,733
P018.S.09.A.C03	3,533	319	0,464	2,253
P018.S.07A.F03	3,528	380	0,444	1,413
P018.S.03.A.C04	3,524	337	0,394	1,483
P018.S.09.A.E05	3,523	353	0,872	2,169
P018.S.04.A.E02	3,516	463	0,676	1,911
P018.S.01.A.B05	3,503	376	0,453	1,882
P018.S.04.A.B05	3,502	414	0,308	1,084
P018.S.01.A.G03	3,495	358	-0,105	1,214
P018.S.10.A.F05	3,491	335	0,267	1,341
P018.S.02.A.B05	3,485	374	0,201	1,761
P018.S.04.A.G04	3,479	335	0,451	1,571
P018.S.07.A.H02	3,471	283	0,107	1,222
P018.S.05.A.H02	3,469	336	0,369	1,899

ES 2 755 527 T3

ID de anticuerpo Anti-CD27	ELISA	Ensayo de unión celular	Ensayo funcional	
	[corr. abs.]	[RFU]	IL-8 [corr. abs.]	Entrecruzado por IL-8 de fragmento F(ab') ₂ [corr. abs.]
P01B.S.03.A.F02	3,464	276	0,736	1,221
P018.S.04.A.H04	3,463	291	0,579	1,982
P018.S.07.A.C04	3,453	300	0,302	1,645
P018.5.09.A.C06	3,452	219	1,943	2,304
P018.S.01.A.E06	3,446	291	0,448	1,401
P018.S.01.A.H06	3,445	422	0,270	2,181
P018.S.07A.A0S	3,441	379	0,408	1,033
P018.S.02.A.F05	3,440	307	0,395	1,165
P018-S-03.A.A02	3,438	373	0,651	2,203
P018.S.03.A.G02	3,435	275	0,412	1,280
P018.S.10.A.G05	3,424	408	0,137	1,249
P018.S.08.A.D01	3,421	394	-0,001	1,120
P018.S.01.A.F02	3,420	326	0,495	2,052
P018.S.07.A.B05	3,418	295	0,203	1,407
P018.S.10.A.H01	3,418	443	0,412	2,288
P018.S.08.A.A01	3,417	448	0,876	1,570
P018.S.04.A.D02	3,416	335	0,294	1,346
P018.S.03.A.B02	3,411	308	0,366	1,489
P018.S.06.A.A03	3,411	387	0,576	1,861
P018.S.02.A.G01	3,408	332	0,127	1,518
P018.S.01.A.D04	3,405	341	0,175	2,199
P018.S.07.A.H04	3,403	386	0,158	1,864
P018.S.03.A.G06	3,402	302	0,560	1,364
P018.S.06.A.F01	3,402	310	0,405	1,082

ES 2 755 527 T3

ID de anticuerpo Anti-CD27	ELISA	Ensayo de unión celular	Ensayo funcional	
	[corr. abs.]	[RFU]	IL-8 [corr. abs.]	Entrecruzado por IL-8 de fragmento F(ab') ₂ [corr. abs.]
P018.S.10.A.C06	3,390	395	0,280	1,175
P018.S.04.A.B01	3,383	330	0,508	1,670
P018S.04.A.E04	3,381	283	0,641	1,344
P018.S.02.A.H0S	3,375	252	0,067	1,403
P018.S.04.A.C02	3,373	415	0,235	1,534
P018.S.09.A.D02	3,373	337	1,013	1,746
P018.S.08.A.D02	3,372	407	0,534	1,668
P018.S.05.A.D04	3,372	317	0,246	1,527
P018.S.03.A.D02	3,370	397	0,463	1,469
P018.S.07.A.803	3,369	346	0,612	1,340
P018.S.02.A.C06	3,366	348	0,418	1,590
P018.S.01.A.B04	3,362	382	0,582	2,121
P018.S.03.A.C02	3,362	317	0,373	1,582
P018.S.03.A.H05	3,359	294	0,401	1,391
P018.S.09.A.H04	3,356	314	0,274	1,399
P018.S.04.A.F04	3,355	320	1,600	2,494
P018.S.05.A.E04	3,354	332	0,813	1,329
P018.S.07.A.B06	3,353	372	0,218	1,074
P018.S.05.A.C06	3,351	351	0,539	1,111
P018.S.07.A.F04	3,351	296	0,424	1,582
P018.S.01.A.F05	3,350	369	0,559	1,180
P018.S.05.A.G04	3,349	375	0,393	1,191
P018.S.09.A.D04	3,348	376	0,688	1,660
P018.S.07.A.H06	3,345	327	0,422	1,228

ES 2 755 527 T3

ID de anticuerpo Anti-CD27	ELISA	Ensayo de unión celular	Ensayo funcional	
	[corr. abs.]	[RFU]	IL-8 [corr. abs.]	Entrecruzado por IL-8 de fragmento F(ab') ₂ [corr. abs.]
P018.S.06.A.E01	3,345	354	0,525	1,551
P018.S.07.A.D03	3,340	409	0,569	1,676
P018.S.07.A.D04	3,335	393	0,449	1,810
P018.S.08.A.E02	3,333	387	0,315	1,555
P018.S.04.A.D05	3,331	292	0,241	1,081
P018.S.07.A.G02	3,330	453	0,725	2,408
P018.S.02.A.E06	3,324	331	0,308	1,292
P018.S.03.A.C05	3,321	303	0,544	1,630
P018.S.04.A.A01	3,319	297	0,176	1,471
P018.S.05.A.B02	3,318	259	0,633	1,954
P018.S.08.A.G02	3,316	315	0,598	2,483
P018.S.03.A.F04	3,307	299	0,253	1,593
P018.S.10.A.F01	3,306	329	-0,011	1,052
P018.S.10.A.G03	3,306	386	-0,180	1,300
P018.S.01.A.B03	3,304	387	0,060	1,699
P018.S.05.A.A02	3,301	334	0,212	1,534
P018.S.05.A.A04	3,301	369	0,226	1,371
P018.S.06.A.E02	3,299	357	0,582	1,223
P018.S.10.A.E01	3,298	227	0,257	2,544
P018.S.01.A.E03	3,297	335	0,436	1,220
P018.S.01.A.H02	3,296	317	0,300	2,536
P018.S.01.A.C06	3,296	369	0,325	1,788
P018.S.05.A.F02	3,294	472	0,526	1,913
P018.S.03.A.E04	3,294	356	0,200	1,193

ES 2 755 527 T3

ID de anticuerpo Anti-CD27	ELISA	Ensayo de unión celular	Ensayo funcional	
	[corr. abs.]	[RFU]	IL-8 [corr. abs.]	Entrecruzado por IL-8 de fragmento F(ab') ₂ [corr. abs.]
P018.S.04.A.A05	3,294	206	1,666	2,238
P018.S.07.A.C06	3,293	336	0,408	1,044
P018.S.09.A.D05	3,282	400	0,187	2,109
P018.S.10.A.E06	3,281	215	0,262	2,061
P018.S.06.A.D04	3,280	394	0,444	1,064
P018.S.01.A.E04	3,280	295	0,264	1,149
P018.S.07.A.E03	3,276	227	0,123	1,513
P018.S.04.A.B03	3,276	338	0,394	1,971
P018.S.09.A.E03	3,272	334	0,099	1,545
P018.S.02.A.D04	3,269	390	0,569	1,369
P018.S.01.A.D02	3,258	323	0,675	1,667
P018.S.10.A.B06	3,254	308	0,455	1,461
P018.S.10.A.H02	3,252	144	1,573	2,104
P018.S.02.A.B03	3,251	332	0,120	1,161
P018.S.01.A.C02	3,250	324	0,395	1,478
P018.S.07.A.H05	3,248	256	-0,160	1,186
P018.S.01.A.A04	3,244	315	0,236	1,030
P018.S.01.A.C04	3,243	368	0,383	1,081
P018.S.02.A.F06	3,240	294	0,094	1,728
P018.S.06.A.H04	3,234	331	0,173	1,692
P018.S.06.A.C02	3,232	283	0,519	1,610
P018.S.06.A.A02	3,232	366	0,737	1,811
P018.S.02.A.A01	3,225	350	0,400	1,616
P018.S.01.A.E05	3,222	420	0,209	1,332

ES 2 755 527 T3

ID de anticuerpo Anti-CD27	ELISA	Ensayo de unión celular	Ensayo funcional	
	[corr. abs.]	[RFU]	IL-8 [corr. abs.]	Entrecruzado por IL-8 de fragmento F(ab') ₂ [corr. abs.]
P018.S.03.A.D03	3,216	320	0,281	1,051
P018.S.08.A.A03	3,214	342	0,276	1,639
P018.S.10A.C03	3,214	360	0,079	1,561
P018.S.03.A.G03	3,207	292	0,546	1,585
P018.S.07.A.E05	3,198	317	0,055	1,151
P018.S.03.A.D06	3,194	360	0,245	1,053
P018.S.01.A.C05	3,189	349	0,327	1,400
P018.S.02.A.G04	3,188	196	0,205	1,674
P018.S.10.A.B01	3,187	333	0,080	1,037
P018.S.10.A.A06	3,181	414	-0,130	1,121
P018.S.06.A.F04	3,176	338	0,678	1,160
P018.S.09.A.A05	3,173	214	0,504	1,953
P018.S.04.A.C05	3,173	292	0,382	1,429
P018.S.01.A.G06	3,171	313	0,491	1,088
P018.S.06.A.F06	3,170	326	0,700	1,030
P018.S.09.A.A03	3,160	360	0,263	1,542
P018.S.06.A.E04	3,160	281	0,327	1,223
P018.S.06.A.F03	3,157	304	0,063	1,082
P018.S.07.A.G04	3,156	177	0,274	1,741
P018.S.10.A.E04	3,154	280	0,339	2,287
P018.S.03.A.H02	3,152	395	0,130	1,071
P018.S.03.A.H03	3,152	289	0,588	1,093
P018.S.03.A.F03	3,151	223	0,106	1,355
P018.S.01.A.A05	3,148	300	0,328	1,086

ES 2 755 527 T3

ID de anticuerpo Anti-CD27	ELISA	Ensayo de unión celular	Ensayo funcional	
	[corr. abs.]	[RFU]	IL-8 [corr. abs.]	Entrecruzado por IL-8 de fragmento F(ab') ₂ [corr. abs.]
P018.S.06.A.C03	3,143	269	0,272	1,131
P018.S.10.A.C05	3,143	11	0,206	2,098
P018.S.01.A.D05	3,140	273	0,089	1,101
P018.S.03.A.B05	3,137	206	0,325	1,213
P018.S.10.A.A04	3,132	175	1,778	2,159
P018.S.06.A.C06	3,132	379	0,128	1,078
P018.S.02.A.G03	3,129	357	-0,061	1,484
P018.S.07.A.C02	3,128	380	0,735	2,020
P018.S.02.A.A06	3,126	293	0,299	1,476
P018.S.01.AE02	3,126	360	0,276	1,172
P018.S.09.A.F05	3,125	400	0,158	1,683
P018.S.09.A.G06	3,120	338	0,467	1,338
P018.S.03.A.D05	3,118	324	0,500	1,504
P018.S.10.A.B02	3,114	249	0,470	1,907
P018.S.04.A.E05	3,111	319	0,747	1,766
P018.S.05.A.A06	3,107	374	0,324	1,582
P018.S.05.A.D03	3,105	321	0,100	1,278
P018.S.08.A.F01	3,102	395	0,211	1,113
P018.S.05.A.B06	3,098	309	0,220	1,700
P018.S.03.A.D04	3,098	270	0,513	1,230
P018.S.01.A.A06	3,091	287	0,566	1,919
P018.S.09.A.A06	3,088	113	2,192	2,251
P018.S.07.A.A02	3,081	314	0,059	1,852
P018.S.07.A.D05	3,080	329	-0,032	1,639

ID de anticuerpo Anti-CD27	ELISA	Ensayo de unión celular	Ensayo funcional	
	[corr. abs.]	[RFU]	IL-8 [corr. abs.]	Entrecruzado por IL-8 de fragmento F(ab') ₂ [corr. abs.]
P018.S.05.A.E03	3,069	322	0,208	1,915
P018.S.10.A.E02	3,016	395	0,230	1,389
P018.S.03.A.G0S	2,981	269	0,031	1,272
P018.S.09.AE02	2,981	305	0,172	1,610
P018.S.09.A.F06	2,980	218	0,580	2,032
P018.S.06.A.H05	2,977	308	0,278	1,557
P018.S.10.A.H0S	2,961	313	-0,155	1,108
P018.S.06.A.A05	2,954	140	0,433	1,086
P018.S.09.A.A02	2,949	155	0,839	2,458
P018S09A.C02	2,943	323	0,070	1,068
P018.S.06.A.B01	2,943	279	0,106	1,176
P018.S.10.A.C01	2,934	266	-0,046	1,104
P018.S.05.A.D06	2,931	323	0,338	1,228
P018.S.02.A.B01	2,930	332	0,538	1,423
P018.S.10.A.C02	2,905	238	0,631	2,284
P018.S.10.A.F04	2,889	133	0,273	2,324
P018.S.10.A.A03	2,806	198	1,021	2,063
P018.S.05.A.F05	2,310	11	0,189	2,212
P018.S.10.A.B03	2,243	19	-0,032	2,074

Tabla 2. Propiedades de unión y actividad funcional de los anticuerpos agonistas anti-CD134:

ID de anticuerpo Anti-CD134	ELISA	Ensayo de unión celular	Ensayo funcional	
	[corr. abs.]	[RFU]	IL-8 [corr. abs.]	Entrecruzado por IL-8 de fragmento F(ab') ₂ [corr. abs.]
P018.S.03.A.E03	2,718	419	0,314	2,544

ES 2 755 527 T3

ID de anticuerpo Anti-CD134	ELISA	Ensayo de unión celular	Ensayo funcional	
	[corr. abs.]	[RFU]	IL-8 [corr. abs.]	Entrecruzado por IL-8 de fragmento F(ab') ₂ [corr. abs.]
P018.S.04.A.G0S	2,865	451	-0,022	2,414
P018.S.04.A.F05	2,439	368	0,181	2,397
P018.S.05.A.G03	0,056	40	0,032	2,391
P018.S.05.A.G05	2,619	463	2,616	2,387
P018.S.04.A.H05	2,972	451	0,356	2,386
P018.S.04.A.E06	0,206	140	0,135	2,381
P018.S.02.A.F01	2,690	498	0,115	2,341
P018.S.04.A.D06	2,493	510	1,009	2,302
P018.S.04.A.B06	2,638	482	1,824	2,271
P018.S.12.A.E04	2,208	659	0,455	2,234
P018.S.04.A.A06	2,853	486	0,879	2,211
P018.S.04.A.F06	2,358	402	2,071	2,210
P018.S.11.A.C04	1,963	406	0,253	2,195
P018S.12.A.H05	2,373	527	0,348	2,190
P018.S.12.A.G05	2,045	570	0,130	2,190
P018.S.11.A.C03	1,535	507	0,586	2,189
P018.S.12.A.D06	0,865	180	0,832	2,171
P018.S.12.A.F05	2,124	511	0,341	2,165
P018.S.11.A.A06	1,845	537	0,732	2,164
P018.S.11.A.F05	1,669	396	0,330	2,155
P018.S.12.A.F03	2,450	485	0,527	2,153
P018.S.12.A.D0S	2,130	451	-0,007	2,152
P018.S.11.A.A05	1,898	550	0,260	2,149
P018.S.12.A.B05	2,103	536	0,960	2,147

ES 2 755 527 T3

ID de anticuerpo Anti-CD134	ELISA	Ensayo de unión celular	Ensayo funcional	
	[corr. abs.]	[RFU]	IL-8 [corr. abs.]	Entrecruzado por IL-8 de fragmento F(ab') ₂ [corr. abs.]
P018.S.12.A.C02	2,052	571	0,936	2,143
P018.S.12.A.A01	2,414	600	0,071	2,137
P018.S.11.A.F04	2,251	486	0,568	2,113
P018.S.04.A.B04	3,208	331	1,990	2,112
P018.S.12.A.C03	1,956	483	0,238	2,108
P018.S.12.A.B01	2,341	607	0,396	2,107
P018.S.12.A.E05	1,933	523	0,132	2,107
P018.S.12.A.G03	2,521	452	0,209	2,105
P018.S.11.A.B06	2,133	441	0,403	2,105
P018.S.11.A.B03	2,660	527	-0,075	2,104
P018.S.12.A.C06	2,346	525	0,881	2,101
P018.S.11.A.G03	2,112	450	1,573	2,101
P018.S.12.A.B06	1,404	451	1,845	2,071
P018.S.11.A.G02	1,070	357	0,270	2,061
P018.S.12.A.C01	2,493	496	-0,026	2,058
P018.S.12.A.B03	1,182	446	1,074	2,054
P018.S.11.A.G05	2,363	531	0,031	2,053
P018.S.12.A.F06	1,645	500	0,374	2,052
P018.S.12.A.A06	1,613	515	0,062	2,043
P018.S.11.A.D04	2,070	530	0,380	2,043
P018.S.11.A.E02	2,652	525	0,214	2,043
P018.S.12.A.E01	2,547	463	0,439	2,038
P018.S.11.A.A03	1,930	459	1,381	2,011
P018.S.11.A.H05	1,691	478	1,207	2,010

ES 2 755 527 T3

ID de anticuerpo Anti-CD134	ELISA	Ensayo de unión celular	Ensayo funcional	
	[corr. abs.]	[RFU]	IL-8 [corr. abs.]	Entrecruzado por IL-8 de fragmento F(ab') ₂ [corr. abs.]
P018.S.04.A.C06	2,501	458	0,538	2,005
P018.S.12.A.E03	2,043	482	0,461	2,005
P018.S.12.A.G04	2,082	534	0,407	1,994
P018.S.11.A.A04	2,105	582	0,533	1,993
P018.S.12.A.F02	2,074	549	0,185	1,991
P018.S.11.A.D06	0,744	130	0,019	1,966
P018.S.12.A.B02	2,208	560	-0,167	1,966
P018.S.02.A.H03	0,468	198	2,557	1,954
P018.S.11.A.H06	2,516	498	0,567	1,949
P018.S.12.A.F04	2,109	551	0,289	1,946
P018.S.12.A.A03	1,440	493	0,393	1,945
P018.S.11.A.F03	1,852	522	0,380	1,936
P018.S.08.A.B03	2,661	477	0,709	1,935
P018.S.12.A.H04	1,984	295	-0,121	1,889
P018.S.12.A.E06	2,302	493	0,054	1,866
P018.S.12.A.D04	2,227	488	0,139	1,865
P018.S.12.A.G01	1,560	526	1,326	1,862
P018.S.11.A.D03	1,993	482	2,243	1,861
P018.S.11.A.E04	1,314	416	-0,194	1,834
P018.S.12.A.H01	1,888	523	0,430	1,834
P018.S.12.A.D03	1,345	559	0,707	1,830
P018.S.12.A.C04	2,044	509	0,215	1,829
P018.S.11.A.B05	1,651	456	1,360	1,826
P018.S.12.A.G02	2,331	530	0,212	1,806

ID de anticuerpo Anti-CD134	ELISA	Ensayo de unión celular	Ensayo funcional	
	[corr. abs.]	[RFU]	IL-8 [corr. abs.]	Entrecruzado por IL-8 de fragmento F(ab') ₂ [corr. abs.]
P018.S.11.A.H02	2,802	515	0,783	1,803
P018.S.11.A.E03	0,276	318	0,481	1,791
P018.S.12.A.D02	2,642	472	0,333	1,773
P018.S.11.A.G04	2,128	482	0,014	1,752
P018.S.02.A.F03	2,851	140	0,090	1,732
P018.S.11.A.E06	2,047	554	0,278	1,722
P018.S.0S.A.F05	2,411	392	0,187	1,711
P018.S.11.A.B04	1,426	444	-0,087	1,657
P018.S.12.A.C05	2,941	494	0,228	1,653
P018.S.12.A.E02	2,589	497	0,355	1,629
P018.S.11.A.H04	2,648	382	0,610	1,612
P018.S.13.A.G06	0,002	0	-0,114	1,585
P018.S.12.A.A02	1,577	502	0,145	1,569
P018.S.12.A.A05	2,862	503	0,267	1,526
P018.S.11.A.E05	1,660	407	-0,265	1,422
P018.S.04.A.E01	2,876	22	0,084	1,405
P018.S.12.A.A04	1,985	514	-0,007	1,401
P018.S.11.A.F02	2,426	503	-0,011	1,382
P018.S.12.A.H03	2,477	496	-0,074	1,275
P018.S.04.AF04	0,000	11	-0,129	1,132

Tabla 3. Propiedades de unión y actividad funcional de los anticuerpos agonistas anti-CD 137:

ID de anticuerpo Anti-CD137	ELISA	Ensayo de unión celular	Ensayo funcional	
	[corr. abs.]	[RFU]	IL-8 [corr. abs.]	Entrecruzado por IL-8 de fragmento F(ab') ₂ [corr. abs.]
P018.S.13.A.A05	0,687	0	0,559	2,570
P018.S.14.A.H01	2,968	6	2,015	2,193
P018.S.08.A.E03	3,047	9	-0,304	2,019
P018.S.13.A.G04	0,577	1	-0,179	1,801
P018.S.13.A.A06	3,388	38	-0,153	1,712
P018.S.08.A.A04	3,418	46	0,368	1,546
P018.S.14.A.D06	2,896	1	-0,011	1,523
P018.S.13.A.C02	2,551	8	0,113	1,399
P018.S.08.A.F03	2,330	7	-0,346	1,356
P018.S.14.A.G03	2,072	19	0,222	1,140
P018.S.14.A.A04	3,440	81	0,785	0,972
P018.S.13.A.G03	1,725	13	-0,164	0,789

Tabla 4. Valores de EC50 de los anticuerpos anti-CD27 agonistas:

ID de anticuerpo Anti-CD27	EC 50 [ng/mL]
P018.S.10.A.H02	122,2
P018.S.09.A.A02	144,1
P018.S.09.A.C06	220,9
P018.S.10.A.E04	233,6
P018.S.09.A.H06	329,1
P018.S.10.A.A04	334,7
P018.S.10.A.C05	340,1
P018.S.05.A.F05	376,4
P018.S.09.A.H03	387,0
P018.S.09.A.A06	387,2

ID de anticuerpo Anti-CD27	EC 50 [ng/mL]
P018.S.04.A.A05	407,7
P018.S.10.A.C02	414,3
P018.S.07.A.G02	430,4
P018.S.10.A.H01	431,0
P018.S.09.A.E05	502,0
P018.S.10.A.A03	512,8
P018.S.02.A.G03	526,1
P018.S.09.A.D05	561,2
P018.S.06.A.A02	575,3
P018.S.10.A.E01	721,5
P018.S.07.A.C04	801,5
P018.S.04.A.A04	819,8
P018.S.03.A.A02	834,9
P018.S.01.A.B04	855,7
P018.S.09.A.C03	1022,1
P018.S.01.A.H02	1109,2
P018.S.10.A.F04	1266,5
P018.S.01.A.D04	1302,2
P018.S.01.A.F05	1322,3
P018.S.04.A.F04	1444,2
P018.S.08.A.G02	1935,4
P018.S.10.A.B03	1936,1
P018.S.01.A.H06	2346,5

Tabla 5. Valores de EC50 de anticuerpos anti-CD 134 agonistas:

ID de anticuerpo Anti-CD134	EC 50 [ng/mL]
P018.S.12.A.B05	102,1

ES 2 755 527 T3

ID de anticuerpo Anti-CD134	EC 50 [ng/mL]
P018.S.11.A.D03	175,8
P018.S.02.A.H03	214,9
P018.S.11.AC03	217,2
P018.S.04.A.F05	224,6
P018.S.04.A.D06	354,6
P018.S.12.A.C01	431,5
P018.S.04.A.F06	440,1
P018.S.04.A.B06	460,8
P018.S.03.A.E03	528,9
P018.S.04.A.A06	629,9
P018.S.04.A.G05	669,5
P018.S.12.A.F05	732,5
P018.S.12.A.G05	745,0
P018.S.11.A.C04	785,3
P018.S.11.A.A05	865,3
P018.S.11.A.G03	893,9
P018.S.05.A.G03	966,4
P018.S.05.A.G05	974,5
P018.S.12A.E04	1005,0
P018.S.04.A.H05	1167,0
P018.S.04.A.E06	1390,5
P018.S.12.A.F03	1630,3
P018.S.11.A.A06	2094,9
P018.S.12.A.D05	2401,8
P018.S.12.A.D06	2773,7
P018.S.05.A.F05	7119,8

Tabla 6. Valores de EC50 de anticuerpos anti-CD137 agonistas:

ID de anticuerpo Anti-CD137	EC 50 [ng/mL]
P018.S.08.A.F03	2710,1
P018.S.13.A.C02	3498,0
P018.S.14.A.G03	3499,7
P018.S.13.A.A05	3722,8
P018.S.13.A.G03	4776,3
P018.S.08.A.E03	4963,8
P018.S.08.A.A04	5152,8
P018.S.14.A.H01	5818,0
P018.S.14.A.A04	6789,0
P018.S.13.A.A06	7785,1
P018.S.14.A.D06	10208,0
P018.S.13.A.G04	255179,8

Tabla 7. Información de secuencia de anticuerpos anti-CD27 agonistas (dominios variables y CDRs):

ID corta	ID de anticuerpo anti-CD27	SEQ ID NOs de VH/VL de dominios variables	SEQ ID NOs de CDRs HCDR1/HCDR2/HCDR3 LCDR1/LCDR2/LCDR3
AB27_1	P018.S.01.A.A04	1/2	373/374/375 376/377/378
AB27_2	P018.S.01.A.A05	3/4	379/380/381 382/383/384
AB27_3	P018.S.01.A.A06	5/6	385/386/387 388/389/390
A627_4	P018.S.01.A.B03	7/8	391/392/393 394/395/396
AB27_5	P018.S.01.A.B04	9/10	397/398/399 400/401/402
AB27_6	P018.S.01.A.B05	11/12	403/404/405 406/407/408
A827_7	P018.S.01.A.C02	13/14	409/410/411 412/413/414
AB27_8	P018.S.01.A.C04	15/16	415/416/417 418/419/420
AB27_9	P018.S.01.A.C05	17/18	421/422/423 424/425/426
AB27_10	P018.S.01.A.C06	19/20	427/428/429 430/431/432

ES 2 755 527 T3

ID corta	ID de anticuerpo anti-CD27	SEQ ID NOs de VH/VL de dominios variables	SEQ ID NOs de CDRs HCDR1/HCDR2/HCDR3 LCDR1/LCDR2/LCDR3
AB27_11	P018.S.01.A.D02	21/22	433/434/435 436/437/438
AB27_12	P018.S.01.A.D04	23/24	439/440/441 442/443/444
AB27_13	P018.S.01.A.D05	25/26	445/446/447 448/449/450
AB27_14	P018.S.01.A.E02	27/28	451/452/453 454/455/456
AB27_15	P018.S.01.A.E03	29/30	457/458/459 460/461/462
AB27_16	P018.S.01.A.E04	31/32	463/464/465 466/467/468
AB27_17	P018.S.01.A.E05	33/34	469/470/471 472/473/474
AB27_18	P018.S.01.A.E06	35/36	475/476/477 478/479/480
AB27_19	P018.S.01.A.F02	37/38	481/482/483 484/485/486
AB27_20	P018.S.01.A.F05	39/40	487/488/489 490/491/492
AB27_21	P018.S.01.A.G02	41/42	493/494/495 496/497/498
AB27_22	P018.S.01.A.G03	43/44	499/500/501 502/503/504
AB27_23	P018.S.01.A.G04	45/46	505/506/507 508/509/510
AB27_24	P018.S.01.A.G06	47/48	511/512/513 514/515/516
AB27_25	P018.S.01.A.H02	49/50	517/518/519 520/521/522
AB27_26	P018.S.01.A.H06	51/52	523/524/525 526/527/528
AB27_27	P018.S.02.A.A01	53/54	529/530/531 532/533/534
AB27_28	P018.S.02.A.A06	55/56	535/536/537 538/539/540
AB27_29	P018.S.02.A.B01	57/58	541/542/543 544/545/546
AB27_30	P018.S.02.A.B03	59/60	547/548/549 550/551/552
AB27_31	P018.S.02.A.B05	61/62	553/554/555 556/557/558
AB27_32	P018.S.02.A.C06	63/64	559/560/561 562/563/564
AB27_33	P018.S.02.A.D04	65/66	565/566/567 568/569/570
AB27_34	P018.S.02.A.E06	67/68	571/572/573 574/575/576
AB27_35	P018.S.02.A.F05	69/70	577/578/579 580/581/582

ES 2 755 527 T3

ID corta	ID de anticuerpo anti-CD27	SEQ ID NOs de VH/VL de dominios variables	SEQ ID NOs de CDRs HCDR1/HCDR2/HCDR3 LCDR1/LCDR2/LCDR3
AB27_36	P018.S.02.A.F06	71/72	583/584/585 586/587/588
AB27_37	P018.S.02.A.G01	73/74	589/590/591 592/593/594
AB27_38	P018.S.02.A.G03	75/76	595/596/597 598/599/600
AB27_39	P018.S.02.A.G04	77/78	601/602/603 604/605/606
AB27_40	P018.S.02.A.H05	79/80	607/608/609 610/611/612
AB27_41	P018.S.03.A.A02	81/82	613/614/615 616/617/618
AB27_42	P018.S.03.A.B02	83/84	619/620/671 622/623/ 624
AB27_43	P018.S.03.A.B05	85/86	625/626/627 628/629/630
AB27_44	P018.S.03.A.C02	87/88	631/632/633 634/635/636
AB27_45	P018.S.03.A.C04	89/90	637/638/639 640/641/642
AB27_46	P018.S.03.A.C05	91/92	643/644/645 646/647/648
AB27_47	P018.S.03.A.D02	93/94	649/650/651 652/653/654
AB27_48	P018.S.03.A.D03	95/96	655/656/657 658/659/660
AB27_49	P018.S.03.A.D04	97/98	661/662/663 664/665/666
AB27_50	P018.S.03.A.D05	99/100	667/668/669 670/671/672
AB27_51	P018.S.03.A.D06	101/102	673/674/675 676/677/678
AB27_52	P018.S.03.A.E04	103/104	679/ 680/681 682/683/684
AB27_53	P018.S.03.A.F02	105/106	685/686/687 688/689/690
AB27_54	P018.S.03.A.F03	107/108	691/692/693 694/695/696
AB27_55	P018.S.03.A.F04	109/110	697/698/699 700/701/702
AB27_56	P018.S.03.A.G02	111/112	703/704/705 706/707/708
AB27_57	P018.S.03.A.G03	113/114	709/710/711 712/713/714
AB27_58	P018.S.03.A.G05	115/116	715/716/717 718/719/720
AB27_59	P018.5.03.A.G06	117/118	721/722/723 724/725/726
AB27_60	P018.S.03.A.H02	119/120	727/728/729 730/731/732

ES 2 755 527 T3

ID corta	ID de anticuerpo anti-CD27	SEQ ID NOs de VH/VL de dominios variables	SEQ ID NOs de CDRs HCDR1/HCDR2/HCDR3 LCDR1/LCDR2/LCDR3
AB27_61	P018.S.03.A.H03	121/122	733/734/735 736/737/738
AB27_62	P018.S.03.A.H04	123/124	739/740/741 742/743/744
AB27_63	P018.S.03.A.H05	125/126	745/746/747 748/749/750
AB27_64	P018.S.04.A.A01	127/128	751/752/753 754/755/756
AB27_65	P018.S.04.A.A0S	129/130	757/758/759 760/761/762
AB27_66	P018.S.04.A.B01	131/132	763/764/765 766/767/768
AB27_67	P018.S.04.A.B03	133/134	769/770/771 772/773/774
AB27_68	P018.S.04.A.B05	135/136	775/776/777 77S/779/780
AB27_69	P018.S.04.A.C02	137/138	781/782/783 784/785/786
AB27_70	P018.S.04.A.C05	139/140	787/788/789 790/791/792
AB27_71	P01S.S.04.A.D02	141/142	793/794/795 796/797/798
AB27_72	P018.S.04.A.D04	143/144	799/800/801 802/803/804
AB27_73	P018.S.04.A.D05	145/146	805/806 807 808/809/810
AB27_74	P018.S.04.A.E02	147/148	811/812/813 814/815/816
AS27_75	P018.S.04.A.E04	149/150	817/818/819 820/871/822
AB27_76	P018.S.04.A.E05	151/152	823/824/825 826/827/828
AB27_77	P018.S.04.A.F04	153/154	829/830/831 832/833/834
A827_78	P018.S.04.A.G04	155/156	835 /836/837 838/839/840
AB27_79	P018.S.04.A.H04	157/158	841/842/843 844/845/846
AB27_80	P018.S.05.A.A02	159/160	847/848/849 850/851/852
AB27_81	P018.S.05.A.A04	161/162	853/854/855 856/857/859
AB27_82	P018.S.05.A.A06	163/164	859/860/861 862/863/864
AB27_83	P018.S.05.A.B02	165/166	865/866/867 868/869/870
AB27_84	P018.S.05.A.B06	167/168	871/872/873 874/875/876
AB27_85	P018.S.05.A.C06	169/170	877/878/879 880/881/882

ES 2 755 527 T3

ID corta	ID de anticuerpo anti-CD27	SEQ ID NOs de VH/VL de dominios variables	SEQ ID NOs de CDRs HCDR1/HCDR2/HCDR3 LCDR1/LCDR2/LCDR3
AB27_86	P018.S.05.A.D03	171/172	883/884/885 886/887/888
AB27_87	P018.S.05.A.D04	173/174	889/890/891 892/893/894
AB27_88	P018.S.05.A.D06	175/176	895/896/ 897 898/899/900
AB27_89	P018.S.05.A.E03	177/178	901/902/903 904/905/906
AB27_90	P018.S.05.A.E04	179/180	907/908/909 910/911/912
AB27_91	P018.S.05.A.F02	181/182	913/914/915 916/917/918
AB27_92	P018.S.05.A.F05	183/184	919/920/921 922/923/924
AB27_93	P018.S.05.A.G04	185/186	925/926/927 928/929/930
AB27_94	P018.S.05.A.H02	187/188	931/932/933 934/935/936
AB27_95	P018.S.06.A.A02	189/190	937/938/939 940/941/942
AB27_96	P018.S.06.A.A03	191/192	943/944/945 946/947/948
AB27_97	P018.S.06.A.A05	193/194	949/950/951 952/953/954
AB27_98	P018.S.06.A.B01	195/196	955/956/957 958/959/960
AB27_99	P018.S.06.A.B03	197/198	961/962/963 964/965/966
A827_100	P018.S.06.A.C02	199/200	967/968/969 970/971/972
AB27_101	P018.S.06.A.C03	201/202	973/974/975 976/977/978
AB27_102	P018.S.06.A.C06	203/204	979/980/981 982/983/984
AB27_103	P018.S.06.A.D04	205/206	985/986/987 988/989/990
AB27_104	P018.S.06.A.E01	207/208	991/992/993 994/995/996
AB27_105	P018.S.06.A.E02	209/210	997/998/999 1000/1001/1002
AB27_106	P018.S.06.A.E04	211/212	1003/1004/1005 1006/1007/1008
AB27_107	P018.S.06.A.F01	213/214	1009/1010/1011 1012/1013/1014
AB27_108	P018.S.06.A.F03	215/216	1015/1016/1017 1018/1019/1020
AB27_109	P01S.S.06.A.F04	217/218	1021/1022/1023 1024/1025/1026
AB27_110	P018.S.06.A.F06	219/220	1027/1028/1029 1030/1031/1032

ES 2 755 527 T3

ID corta	ID de anticuerpo anti-CD27	SEQ ID NOs de VH/VL de dominios variables	SEQ ID NOs de CDRs HCDR1/HCDR2/HCDR3 LCDR1/LCDR2/LCDR3
AB27_111	P018.S.06.A.H04	221/222	1033/1034/1035 1036/1037/1038
AB27_112	P018.S.06.A.H05	223/224	1039/1040/1041 1042/1043/1044
AB27_113	P018.5.07.A.A02	225/226	1045/1046/1047 1048/1049/1050
AB27_114	P018.S.07.A.A05	227/228	1051/1052/1053 1054/1055/1056
AB27_115	P018.S.07.A.B03	229/230	1057/1058/1059 1060/1061/1062
AB27_116	P018.S.07.A.B04	231/232	1063/1064/1065 1066/1067/1068
AB27_117	P018.S.07.A.B0S	233/234	1069/1070/1071 1072/1073/1074
AB27_118	P018.S.07.A.B06	235/236	1075/1076/1077 1078/1079/1080
AB27_119	P018.S.07.A.C02	237/238	1081/1082/1083 1084/1085/1086
AB27_120	P018.S.07.A.C04	239/240	1087/1088/1089 1090/1091/1092
AB27_121	P018.S.07.A.C06	241/242	1093/1094/1095 1096/1097/1098
AB27_122	P018.S.07.A.D03	243/244	1099/1100/1101 1102/1103/1104
AB27_123	P018.S.07.A.D04	245/246	1105/1106/1107 1108/1109/1110
AB27_124	P018.5.07.A.D05	247/248	1111/1112/1113 1114/1115/1116
AB27_125	P018.S.07.A.E03	249/250	1117/1118/1119 1120/1121/1122
AB27_126	P018.S.07.A.E0S	251/252	1123/1124/1125 1126/1127/1128
AB27_127	P018.S.07.A.F03	253/254	1129/1130/1131 1132/1133/1134
AB27_128	P018.S.07.A.F04	255/256	1135/1136/1137 1138/1139/1140
AB27_129	P018.S.07.A.G02	257/258	1141/1142/1143 1144/1145/1146
AB27_130	P018.S.07.A.G04	259/260	1147/1148/1149 1150/1151/1152
AB27_131	P018.S.07.A.H02	261/262	1153/1154/1155 1156/1157/1158
AB27_132	P018.S.07.A.H04	263/264	1159/1160/1161 1162/1163/1164
AB27_133	P018.S.07.A.H0S	265/266	1165/1166/1167 1168/1169/1170
AB27_134	P018.S.07.A.H06	267/268	1171/1172/1173 1174/1175/1176
AB27_135	P018.S.08.A.A01	269/270	1177 /1178/1179 1180/1181/1182

ES 2 755 527 T3

ID corta	ID de anticuerpo anti-CD27	SEQ ID NOs de VH/VL de dominios variables	SEQ ID NOs de CDRs HCDR1/HCDR2/HCDR3 LCDR1/LCDR2/LCDR3
AB27_136	P018.S.08.A.A03	271/272	1183/1184/1185 1186/1187/1188
AB27_137	P018.S.08.A.D01	273/274	1189/1190/1191 1192/1193/1194
AB27_138	P018.S.08.A.D02	275/276	1195/1196/1197 1198/1199/1200
AB27_139	P018.S.08.A.E02	277/278	1201/1202/1203 1204/1205/1206
AB27_140	P018.5.08.A.F01	279/280	1207/1208/1209 1210/1211/1212
AB27_141	P018.S.08.A.G02	281/282	1213/1214/1215 1216/1217/1218
AB27_142	P018.S.08.A.H02	283/284	1219/1220/1221 1222/1223/1224
AB27_143	P018.S.09.A.A02	285/286	1225/1226/1227 1228/1229/1230
AB27_144	P018.S.09.A.A03	287/288	1231/1232/1233 1234/1235/1236
AB27_145	P018.S.09.A.A05	289/290	1737/1238/1239 1240/ 1241/1242
AB27_146	P018.S.09.A.A06	291/292	1243/1244/1245 1246/1247/1248
AB27_147	P018.S.09.A.C02	293/294	1249/1250/1251 1252/1253/1254
AB27_148	P018.S.09.A.C03	295/296	1255/1256/1257 1258/1259/1260
AB27_149	P018.S.09.A.C06	297/298	1261/1262/1263 1264/1265/1266
A827_150	P018.S.09.A.D02	299/300	1267/1268/1269 1270/1271/1272
AB27_151	P018.S.09.A.D04	301/302	1273/1274/1275 1276/1277/1278
AB27_152	P018.S.09.A.D0S	303/304	1279/1280/1281 1282/1283/1284
AB27_153	P018.S.09.A.E02	305/306	1285/1286/1287 1288/1289/1290
AB27_154	P018.S.09.A.E03	307/308	1291/1292/1293 1294/1295/1296
AB27_155	P018.S.09.A.E05	309/310	1297/1298/1299 1300/1301/1302
AB27_156	P018.S.09.A.E06	311/312	1303/1304/1305 1306/1307/1308
AB27_157	P018.S.09.A.F0S	313/314	1309/1310/1311 1312/1313/1314
AB27_158	P018.S.09.A.F06	315/316	1315/1316/1317 1318/1319/1320
AB27_159	P018.S.09.A.G06	317/318	1321/1322/1323 1324/1325/1326
AB27_160	P018.S.09.A.H03	319/320	1327/1328/1329 1330/1331/1332

ES 2 755 527 T3

ID corta	ID de anticuerpo anti-CD27	SEQ ID NOs de VH/VL de dominios variables	SEQ ID NOs de CDRs HCDR1/HCDR2/HCDR3 LCDR1/LCDR2/LCDR3
AB27_161	P018.S.09.A.H04	321/322	1333/1334/1335 1336/1337/1338
AB27_162	P018.S.09.A.H06	323/324	1339/1340/1341 1342/1343/1344
AB27_163	P018.S.10.A.A03	325/326	1345/1346/1347 1348/1349/1350
AB27_164	P018.S.10.A.A04	327/328	1351/1352/1353 1354/1355/1356
AB27_165	P018.S.10.A.A06	329/330	1357/1358/1359 1360/1361/1362
AB27_166	P018.S.10.A.B01	331/332	1363/1364/1365 1366/1367/1368
AB27_167	P018.S.10.A.B02	333/334	1369/1370/1371 1372/1373/1374
AB27_168	P018.S.10.A.B03	335/336	1375/1376/1377 1378/1379/1380
AB27_169	P018.S.10.A.B06	337/338	1381/1382/1383 1384/1385/1386
AB27_170	P018.S.10.A.C01	339/340	1387/1388/1389 1390/1391/1392
AB27_171	P018.S.10.A.C02	341/342	1393/1394/1395 1396/1397/1398
AB27_172	P018.S.10.A.C03	343/344	1399/1400/1401 1402/1403/1404
AB27_173	P018.S.10.A.C05	345/346	1405/1406/1407 1408/1409/1410
AB27_174	P018.S.10.A.C06	347/348	1411/1412/1413 1414/1415/1416
AB27_175	P018.S.10.A.E01	349/350	1417/1418/1419 1420/1421/1422
AB27_176	P018.S.10.A.E02	351/352	1423/1424/1425 1426/1427/1428
AB27_177	P018.S.10.A.E04	353/354	1429/1430/1431 1432/1433/1434
AB27_178	P018.S.10.A.E06	355/356	1435/1436/1437 1438/1439/1440
AB27_179	P018.S.10.A.F01	357/358	1441/1442/1443 1444/1445/1446
AB27_180	P018.S.10.A.F04	359/360	1447/1448/1449 1450/1451/1452
AB27_181	P018.S.10.A.F0S	361/362	1453/1454/1455 1456/1457/1458
AB27_182	P018.S.10.A.G03	363/364	1459/1460/1461 1462/1463/1464
AB27_183	P018.S.10.A.G05	365/366	1465/1466/1467 1468/1469/1470
AB27_184	P018.S.10.A.H01	367/368	1471/1472/1473 1474/1475/1476
AB27_185	P018.S.10.A.H02	369/370	1477/1478/1479 1480/1481/1482

ES 2 755 527 T3

ID corta	ID de anticuerpo anti-CD27	SEQ ID NOs de VH/VL de dominios variables	SEQ ID NOs de CDRs HCDR1/HCDR2/HCDR3 LCDR1/LCDR2/LCDR3
AB27_186	P018.S.10.A.H0S	371/372	1483/1484/1485 1486/1487/1488

Tabla 8. Información de secuencia de anticuerpos anti-CD134 agonistas (dominios variables y CDRs)

ID corta	ID de anticuerpo Anti-CD134	SEQ ID NOs de VH/VL de dominios variables	SEQ ID NOs de CDRs HCDR1/HCDR2/HCDR3 LCDR1/LCDR2 /LCDR3
AB134_1	P018.S.02.A.F01	1489/1490	1673/1674/1675 1676/1677/1678
AB134_2	P018.S.02.A.F03	1491/1492	1679/1680/1681 1682/1683/1684
AB134_3	P018.S.02.A.H03	1493/1494	1685/1686/1687 1688/1689 /1690
AB134_4	P018.S.03.A.E03	1495/1496	1691/1692/1693 1694/1695/1696
AB134_5	P018.S.04.A.A06	1497/1498	1697/1698/1699 1700/1701/1702
AB134_6	P018.S.04.A.B04	1499/1500	1703/1704/1705 1706/1707/1708
AB134_7	P018.S.04.A.B06	1501/1502	1709/1710/1711 1712/1713/1714
AB134_8	P018.S.04.A.C06	1503/1504	1715/1716/1717 1718/1719/1720
AB134_9	P018.S.04.A.D06	1505/1506	1721/1722/1723 1724/1725/1726
AB134_10	P018.S.04.A.E01	1507/1508	1727/1728/1729 1730/1731/1732
AB134_11	P018.S.04.A.E06	1509/1510	1733/1734/1735 1736/1737/1738
AB134_12	P018.S.04.A.F0S	1511/1512	1739/1740/1741 1742/1743/1744
AB134_13	P018.S.04.A.F06	1513/1514	1745/1746/1747 1748/1749/1750
AB134_14	P018.S.04.A.G05	1515/1516	1751/1752/1753 1754/1755/1756
AB134_15	P018.S.04.A.H05	1517/1518	1757/1758/1759 1760/1761/1762
AB134_16	P018.S.0S.A.F0S	1519/1520	1763/1764/1765 1766/1767/1768
AB134_17	P018.S.05.A.G03	1521/1522	1769/1770/1771 1772/1773/1774
AB134_18	P018.S.05.A.G05	1523/1524	1775/1776/1777 1778/1779/1780
AB134_19	P018.S.08.A.B03	1525/1526	1781/1782/1783 1784/1785/1786
AB134_20	P018.S.11.A.A03	1527/1528	1787/1788/1789 1790/1791/1792

ES 2 755 527 T3

ID corta	ID de anticuerpo Anti-CD134	SEQ ID NOs de VH/VL de dominios variables	SEQ ID NOs de CDRs HCDR1/HCDR2/HCDR3 LCDR1/LCDR2 /LCDR3
AB134_21	P018.S.11.A.A04	1529/1530	1793/1794/1795 1796/1797/1798
AB134_22	P018.5.11.A.A05	1531/1532	1799/1800/1801 1802/1803/1804
AB134_23	P018.S.11.A.A06	1533/1534	1805/1806/1807 1808/1809/1810
AB134_24	P018.S.11.A.B03	1535/1536	1811/1812/1813 1814/1815/1816
AB134_25	P018.S.11.A.804	1537/1538	1817/1818/1819 1820/1821/1822
AB134_26	P018.S.11.A.B05	1539/1540	1823/1824/1825 1826/1827/1828
AB134_27	P018.S.11.A.B06	1541/1542	1829/1830/1831 1832/1833/1834
AB134_28	P018.S.11.A.C03	1543/1544	1835/1836/1837 1838/1839/1840
AB134_29	P018.S.11.A.C04	1545/1546	1841/1842/1843 1844/1845/1846
AB134_30	P018.S.11.A.D03	1547/1548	1847/1848/1849 1850/1851/1852
AB134_31	P018.S.11.A.D04	1549/1550	1853/1854/1855 1856/1857/1858
AB134_32	P018.S.11.A. D06	1551/1552	1859/1860/1861 1862/1863/1864
AB134_33	P018.S.11.A.E02	1553/1554	1865/1866/1867 1868/1869/1870
AB134_34	P018.S.11.A.E03	1555/1556	1871/1872/1873 1874/1875/1876
AB134_35	P018.S.11.A.E04	1557/1558	1877/1878/1879 1880/1881/1882
AB134_36	P018.S.11.A.E05	1559/1560	1883/1884/1885 1886/1887/1888
AB134_37	P018.S.11.A.E06	1561/1562	1889/1890/1891 1892/1893/1894
AB134_38	P018.S.11.A.F02	1563/1564	1895/1896/1897 1898/1899/1900
AB134_39	P018.S.11.A.F03	1565/1566	1901/1902/1903 1904/1905/1906
AB134_40	P018.S.11.A.F04	1567/1568	1907/1908/1909 1910/1911/1912
A6134_41	P018.S.11.A.F05	1569/1570	1913/1914/1915 1916/1917/1918
AB134_42	P018.S.11.A.G02	1571/1572	1919/1920/1921 1922/1923/1924
AB134_43	P018.S.11.A.G03	1573/1574	1925/1926/1927 1928/1929/1930
A8134_44	P018.S.11.A.G04	1575/1576	1931/1932/1933 1934/1935/1936
AB134_45	P018.S.11.A.G05	1577/1578	1937/1938/1939 1940/1941/1942

ES 2 755 527 T3

ID corta	ID de anticuerpo Anti-CD134	SEQ ID NOs de VH/VL de dominios variables	SEQ ID NOs de CDRs HCDR1/HCDR2/HCDR3 LCDR1/LCDR2 /LCDR3
AB134_46	P018.S.11.A.H02	1579/1580	1943/1944/1945 1946/1947/1948
AB134_47	P018.S.11.A.H04	1581/1582	1949/1950/1951 1952/1953/1954
AB134_48	P018.S.11.A.H05	1583/1584	1955/1956/1957 1958/1959/1960
AB134_49	P018.S.11.A.H06	1585/1586	1961/1962/1963 1964/1965/1966
AB134_50	P018.S.12.A.A01	1587/1588	1967/1968/1969 1970/1971/1972
AB134_51	P018.S.12.A.A02	1589/1590	1973/1974/1975 1976/1977/1978
AB134_52	P018.S.12.A.A03	1591/1592	1979/1980/1981 1982/1983/1984
AB134_53	P018.S.12.A.A04	1593/1594	1985/1986/1987 1988/ 1989 /1990
AB134_54	P018.S.12.A.A05	1595/1596	1991/1992/1993 1994/1995/1996
AB134_55	P018.S.12.A.A06	1597/1598	1997/1998/1999 2000/2001/2002
AB134_56	P018.S.12.A.B01	1599/1600	2003/2004/2005 2006/2007/2008
AB134_57	P018.S.12.A.B02	1601/1602	2009/2010/2011 2012/2013/2014
AB134_58	P018.S.12.A.B03	1603/1604	2015/2016/2017 2018/2019/2020
AB134_59	P018.S.12.A.B05	1605/1606	2021/2022/2023 2024/2025/2026
AB134_60	P018.S.12.A.B06	1607/1608	2027/2028/2029 2030/2031/2032
AB134_61	P018.S.12.A.C01	1609/1610	2033/2034/2035 2036/2037/2038
AB134_62	P018.S.12.A.C02	1611/1612	2039/2040/2041 2042/2043/2044
AB134_63	P018.S.12.A.C03	1613/1614	2045/2046/2047 2048/2049/2050
AB134_64	P018.S.12.A.C04	1615/1616	2051/2052/2053 2054/2055/2056
AB134_65	P018.S.12.A.C05	1617/1618	2057/2058/2059 2060/2061/ 2062
AB134_66	P018.S.12.A.C06	1619/1620	2063/2064/2065 2066/2067/2068
AB134_67	P018.S.12.A.D02	1621/1622	2069/2070/2071 2072/2073/2074
AB134_68	P018.S.12.A.D03	1623/1624	2075/2076/2077 2078/2079/2080
A8134_69	P018.S.12.A.D04	1625/1626	2081/2082/2083 2084/2085/2086
AB134_70	P018.S.12.A.D05	1627/1628	2087/2088/2089 2090/2091/2092

ES 2 755 527 T3

ID corta	ID de anticuerpo Anti-CD134	SEQ ID NOs de VH/VL de dominios variables	SEQ ID NOs de CDRs HCDR1/HCDR2/HCDR3 LCDR1/LCDR2 /LCDR3
AB134_71	P018.S.12.A.D06	1629/1630	2093/2094/2095 2096/2097/2098
AB134_72	P018.S.12.A.E01	1631/1632	2099/2100/2101 2102/2103/2104
AB134_73	P018.S.12.A.E02	1633/1634	2105/2106/2107 2108/2109/2110
AB134_74	P018.S.12.A.E03	1635/1636	2111/2112/2113 2114/2115/2116
AB134_75	P018.S.12.A.E04	1637/1638	2117/2118/2119 2120/2121/2122
AB134_76	P018.S.12.A.E05	1639/1640	2123/2124/2125 2126/2127/ 2128
AB134_77	P018.S.12.A.E06	1641/1642	2129/2130/2131 2132/2133/2134
AB134_78	P018.S.12.A.F02	1643/1644	2135/2136/2137 2138/2139/2140
AB134_79	P018.S.12.A.F03	1645/1646	2141/2142/2143 2144/2145/2146
AB134_80	P018.S.12.A.F04	1647/1648	2147/2148/2149 2150/2151/2152
AB134_81	P018.S.12.A.F05	1649/1650	2153/2154/2155 2156/2157/2158
AB134_82	P018.S.12.A.F06	1651/1652	2159/2160/2161 2162/2163/2164
AB134_83	P018.S.12.A.G01	1653/1654	2165 2166/2167 2168/2169/2170
AB134_84	P018.S.12.A.G02	1655/1656	2171/2172/2173 2174/2175/2176
AB134_85	P018.S.12.A.G03	1657/1658	2177/2178/2179 2180/2181/2182
AB134_86	P018.S.12.A.G04	1659/1660	2183/2184 /2185 2186/2187/2188
AB134_87	P018.S.12.A.G05	1661/1662	2189/2190/2191 2192/2193/2194
AB134_88	P018.S.12.A.H01	1663/ 1664	2195/2196/2197 2198/2199/2200
AB134_89	P018.S.12.A.H03	1665/1666	2201/2202/2203 2204/2205/2206
AB134_90	P018.S.12.A.H04	1667/1668	2207/2208/2209 2210/2211/2212
AB134_91	P018.S.12.A.H05	1669/1670	2213/2214/2215 2216/2217/2218
AB134_92	P018.S.13.A.G06	1671/1672	2219/2220/2221 2222/2223/2224

Tabla 9. Información de secuencia de anticuerpos anti-CD137 agonistas (dominios variables y CDRs):

ID corta	ID de anticuerpo Anti-CD137	SEQ ID NOs de VH/VL de dominios variables	SEQ ID NOs de CDRs HCDR1/HCDR2/HCDR3 LCDR1/LCDR2/LCDR3
AB137_1	P018.S.08.A.A04	2225/2226	2249/2250/2251 2252/2253/2254
AB137_2	P018.S.08.A.E03	2227/2228	2255/2256/2257 2258/2259/2260
AB137_3	P018.S.08.A.F03	2229/2230	2261/2262/2263 2264/2265/2266
AB137_4	P018.S.13.A.A05	2231/2232	2267/2268/2269 2270/2271/2272
AB137_5	P018.S.13.A.A06	2233/2234	2273/2274/2275 2276/2277/2278
AB137_6	P018.S.13.A.C02	2235/2236	2279/2280/2281 2282/2283/2284
AB137_7	P018.S.13.A.G03	2237/2238	2285/2286/2287 2288/2289/2290
AB137_8	P018.S.13.A.G04	2239/2240	2291/2292/2293 2294/2295/2296
AB137_9	P018.S.14.A.A04	2241/2242	2297/2298/2299 2300/2301/ 2302
AB137_10	P018.S.14.A.D06	2243/2244	2303/2304/2305 2306/2307/2308
AB137_J1	P018.5.14.A.G03	2245/2246	2309/2310/2311 2312/2313/2314
AB137_12	P018.S.14.A.H01	2247/2248	2315/2316/2317 2318/2319/2320

Ejemplo 2: anticuerpos biespecíficos direccionados a CD40 y CD27, CD40 y CD137 o CD40 y CD134

2.1 Ensayo de indicador que mide la transactivación

5 CD40 se expresa predominantemente en las células presentadoras de antígeno (APC), tales como las células dendríticas, mientras que CD27, CD134 y CD137 se expresan predominantemente en las células T. Por lo tanto, los anticuerpos biespecíficos que se unen a CD40 y CD27, a CD40 y CD137 o a CD40 y CD134 pueden unirse
10 simultáneamente a las APC y células T que expresan estos receptores. De este modo, estos anticuerpos biespecíficos son capaces de (i) mediar la interacción de célula a célula entre las APC y células T mediante la unión al receptor y (ii) activar ambos receptores indicados a la vez, lo cual es inducido principalmente por el entrecruzamiento y la agrupación de receptores tras la interacción de célula a célula y no necesariamente dependiente de la actividad agonista de los anticuerpos bivalentes monoespecíficos parentales. Por lo tanto, estos anticuerpos biespecíficos transactivadores ejercen actividad coestimuladora en el contexto de las interacciones APC: células T.

15 Se estableció un sistema de ensayo informador correspondiente. Con ese fin, las células HEK293_NFK_gfp_luc se transdujeron de manera estable con receptores TNF humanos, CD27, CD40, CD134 y CD137, respectivamente. HEK293_NFK_gfp_luc (NF- κ B/293/GFP-LucTM Transcriptional Reporter Cell Line obtenida de System Biosciences) es una línea celular informadora que permite monitorizar la ruta NF- κ B mediante la detección de fluorescencia de GFP, así como la actividad de luciferasa para ensayos indicadores de activación de transcripción cuantitativa. Adicionalmente, las células K562 se transdujeron de manera estable con receptores humanos de TNF, CD27, CD40,
20 CD134 y CD137, también, con el fin de generar líneas celulares que median la trans-presentación de los receptores indicados. La expresión de la superficie celular de los receptores en las células HEK293_NFK_gfp_luc y las células K562 se analizó mediante citometría de flujo representada en la Figura 6A y la Figura 6B.

25 El ensayo informador que midió la transactivación se configuró de la siguiente manera: las células HEK293_NFK_gfp_luc que expresaban uno de los 4 receptores de TNF indicados se sembraron en placas de cultivo de múltiples pocillos. Los anticuerpos biespecíficos y los anticuerpos de control monoespecíficos correspondientes se agregaron en concentraciones desde 100 ng/ml hasta 10.000 ng/ml. Las células K562 que expresan el segundo receptor de TNF o K562 de tipo silvestre (K562_wt) se agregaron a los pocillos indicados. Por lo tanto, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse al primer receptor de TNF en la línea celular HEK293_NFK_gfp_luc y, al mismo tiempo, al segundo receptor de TNF en la línea celular K562 que media la trans-presentación. Solamente la activación del

receptor del primer receptor de TNF en las células HEK293_NFK_gfp_luc se mide mediante la actividad de luciferasa inducida por la señalización de NF-κB. Por lo tanto, los anticuerpos biespecíficos direccionados a CD40 y CD27, CD40 y CD137 o CD40 y CD134 se analizaron mediante dos ensayos informadores: (i) el primer ensayo que mide la activación de CD27-, CD134 o CD137 tras la presentación cruzada por K562_CD40 y (ii) el segundo ensayo que mide la activación de CD40 tras la presentación cruzada por K562_CD27, K562_CD134 o K562_CD137, respectivamente.

2.2 Análisis de anticuerpos biespecíficos CD40xCD137

Los anticuerpos biespecíficos que se unen con un brazo a CD40 y con el segundo brazo a CD137 se produjeron y analizaron mediante los dos ensayos Trans-reporter utilizando HEK293_NFK_CD40_gfp_luc + K562_CD137 y HEK293_NFK_CD137_gfp_luc + K562_CD40. Se probaron dos anticuerpos biespecíficos diferentes, así como los anticuerpos de control, los anticuerpos bivalentes parentales biespecíficos anti-CD40 y anti-CD137 y los anticuerpos monovalentes correspondientes con un brazo irrelevante (Figura 7A y 7B). Todos los anticuerpos se probaron bajo las condiciones de presentación trans indicadas usando células K562 que expresan el segundo receptor de TNF y para el control sin presentación trans usando K562_wt. Ninguno de los anticuerpos de control, ni los anticuerpos bivalentes mono-específicos parentales ni los anticuerpos monovalentes con un brazo irrelevante, indujeron actividad de luciferasa en las células HEK293_NFK_CD40_gfp_luc o en las células HEK293_NFK_CD137_gfp_luc. Solo los dos anticuerpos biespecíficos CD40xCD137 dieron como resultado actividad de luciferasa tras la adición de anticuerpos (100 ng/ml y concentraciones más altas) a las células HEK293_NFK_CD40_gfp_luc o HEK293_NFK_CD137_gfp_luc bajo condiciones de presentación trans. Por lo tanto, incluso si los anticuerpos IgG1 mono-específicos, bivalentes, anti-CD40 y anti-CD137 parentales no muestran actividad agonista, el anticuerpo biespecífico CD40xCD137 es capaz de inducir la activación de ambos receptores dando como resultado una señalización intracelular y la activación de la ruta NF-κB.

2.3 Análisis de anticuerpos biespecíficos CD40xCD27

Se produjo un anticuerpo biespecífico que se une con un brazo a CD40 y con el segundo brazo a CD27 y se analizó mediante los dos ensayos Trans-reporter utilizando HEK293_NFK_CD40_gfp_luc + K562_CD27 y HEK293_NFK_CD27_gfp_luc + K562_CD40. Se probaron el anticuerpo biespecífico, así como los anticuerpos de control, los anticuerpos bivalentes mono-específicos parentales anti-CD40 y anti-CD27 y los anticuerpos monovalentes correspondientes con un brazo irrelevante (Figura 8). Todos los anticuerpos se probaron bajo las condiciones de presentación trans indicadas usando células K562 que expresan el segundo receptor de TNF y para el control sin presentación trans usando K562_wt. El anticuerpo biespecífico (100 ng/ml y concentraciones más altas) indujo una fuerte actividad de luciferasa en HEK293_NFK_CD40_gfp_luc y en las líneas celulares HEK293_NFK_CD27_gfp_luc, respectivamente, bajo condiciones de presentación trans. Por lo tanto, el anticuerpo biespecífico CD40xCD27 puede inducir la activación de ambos receptores dando como resultado una fuerte señalización intracelular y la activación de la ruta NF-κB.

2.4 Análisis de anticuerpos biespecíficos CD40xCD134

Los anticuerpos biespecíficos que se unen con un brazo a CD40 y con el segundo brazo a CD134 se produjeron y analizaron mediante los dos ensayos Trans-reporter utilizando HEK293_NFK_CD40_gfp_luc + K562_CD134 y HEK293_NFK_CD134_gfp_luc + K562_CD40. Se probaron dos anticuerpos biespecíficos diferentes, así como los anticuerpos de control, los anticuerpos bivalentes mono-específicos parentales anti-CD40 y anti-CD 134 y los anticuerpos monovalentes correspondientes con un brazo irrelevante (Figura 9A y 9B). Todos los anticuerpos se probaron bajo las condiciones de presentación trans indicadas usando células K562 que expresan el segundo receptor de TNF y para el control sin presentación trans usando K562_wt. Los anticuerpos bivalentes mono-específicos anti-CD134 parentales indujeron solo una actividad de luciferasa muy débil. Sin embargo, los anticuerpos biespecíficos (100 ng/ml y concentraciones más altas) indujeron una fuerte actividad de luciferasa en HEK293_NFK_CD40_gfp_luc y en las líneas celulares HEK293_NFK_CD134_gfp_luc, respectivamente, bajo condiciones de presentación trans. Por lo tanto, incluso si los anticuerpos parentales mono-específicos, bivalentes anti-CD40 y anti-CD 134 IgG1 muestran solo una ligera actividad agonista, el anticuerpo biespecífico CD40xCD134 puede inducir la activación de ambos receptores dando como resultado una fuerte señalización intracelular y una activación de la ruta NF-κB.

Ejemplo 3: anticuerpos biespecíficos direccionados a CD134 y CD27, CD134 y CD137 o CD27 y CD137

3.1 Ensayo de informador que mide la activación cis

CD27, CD134 y CD137 se expresan predominantemente en células T. Mientras que CD27 se expresa constitutivamente y la densidad de expresión de CD27 solo varía tras la activación de las células T, la expresión de CD134 y CD137 solo se induce tras la activación de las células T. De este modo, los anticuerpos biespecíficos que se unen a CD134 y CD27, a CD134 y CD137 o a CD27 y CD137 más probablemente se dirigen a dos receptores expresados en la misma célula T. Sin embargo, la actividad de estos anticuerpos biespecíficos depende de la coexpresión de los dos receptores y, por lo tanto, del estado de activación de las células T. La activación de estos receptores de TNF depende de la entrecruzamiento del receptor y la agrupación de receptores, respectivamente, lo cual puede lograrse mediante agentes de unión que se unen simultáneamente a diferentes receptores. Si las células T coexpresan los receptores indicados, estos anticuerpos biespecíficos pueden actuar como agentes coestimuladores

que median la señalización inducida por el receptor en las células T tras la unión de dos receptores TNF diferentes en la misma célula T.

5 Se estableció un sistema de ensayo informador correspondiente usando transfectantes dobles de receptor de TNF. Con ese fin, las células HEK293_NFK_gfp_luc se transdujeron de manera estable con dos de los receptores de TNF humanos indicados, CD27, CD134 y CD137, respectivamente. La expresión de la superficie celular de los receptores se analizó mediante citometría de flujo representada en la Figura 10A y la Figura 10B.

3.2 Análisis de anticuerpos biespecíficos CD134xCD27

10 Se produjo un anticuerpo biespecífico que se une con un brazo a CD134 y con el segundo brazo a CD27 y se analizó mediante un ensayo de informador Cis usando células HEK293_NFK_CD27_CD134_gfp_luc. Se probaron el anticuerpo biespecífico, así como los anticuerpos de control, los anticuerpos bivalentes mono-específicos parentales anti-CD134 y anti-CD27 y los anticuerpos monovalentes correspondientes con un brazo irrelevante (Figura 11). El anticuerpo biespecífico indujo la actividad de luciferasa más fuerte en las células HEK293_NFK_CD27_CD134_gfp_luc. Por lo tanto, el anticuerpo biespecífico CD134xCD27 es capaz de inducir una fuerte activación de las células que expresan ambos receptores dando como resultado una fuerte señalización de NF-κB.

3.3 Análisis de anticuerpos biespecíficos CD134xCD137

20 Los anticuerpos biespecíficos que se unen con un brazo a CD134 y con el segundo brazo a CD137 se produjeron y analizaron mediante un ensayo de informador Cis usando la línea celular HEK293_NFK_CD134_CD137_gfp_luc. Se probaron dos anticuerpos biespecíficos diferentes, así como los anticuerpos de control, los anticuerpos bivalentes mono-específicos parentales anti-CD134 y anti-CD137 y los anticuerpos monovalentes correspondientes con un brazo irrelevante (Figura 12A y 12B). Ninguno de los anticuerpos de control, ni los anticuerpos bivalentes mono-específicos parentales ni los anticuerpos monovalentes con un brazo irrelevante, indujeron actividad de luciferasa en el HEK293_NFK_CD134_CD137_gfp_luc. Solo el anticuerpo biespecífico CD134xCD137 dio como resultado actividad de luciferasa. Por lo tanto, incluso si los anticuerpos parentales mono-específicos, bivalentes anti-CD134 y anti-CD137 IgG1 no muestran ninguna actividad agonista, el anticuerpo biespecífico CD134xCD137 es capaz de inducir la activación en la línea celular que expresa ambos receptores dando como resultado la activación de la ruta NF-κB.

3.3 Análisis de anticuerpos biespecíficos CD27xCD137

30 Los anticuerpos biespecíficos que se unen con un brazo a CD137 y con el segundo brazo a CD27 se produjeron y analizaron mediante un ensayo informador Cis usando células HEK293_NFK_CD27_CD137_gfp_luc. Se probaron dos anticuerpos biespecíficos diferentes, así como los anticuerpos de control, los anticuerpos bivalentes mono-específicos parentales anti-CD137 y anti-CD27 y los anticuerpos monoespecíficos correspondientes con un brazo irrelevante (Figura 13A y 13B). En este caso, los anticuerpos anti-CD27 mono-específicos bivalentes parentales indujeron actividad de luciferasa, mientras que el anti-CD 137 bivalente mono-específico parental solo dio como resultado señales de activación máxima extremadamente débiles. Ambos anticuerpos monovalentes de control que consisten en un brazo irrelevante indujeron una activación muy débil de las células HEK293_NFK_CD27_CD137_gfp_luc. Sin embargo, los anticuerpos biespecíficos indujeron una actividad de luciferasa más fuerte en las células HEK293_NFK_CD27_CD137_gfp_luc que los anticuerpos de control con un brazo irrelevante.

REIVINDICACIONES

1. Un agente de unión que comprende al menos dos dominios de unión, en donde un primer dominio de unión se une a un primer receptor de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y un segundo dominio de unión se une a un segundo receptor de la superfamilia de TNF, en donde el primer dominio de unión se une a CD40 y el segundo dominio de unión se une a 4-1BB (CD137), en donde
- 5 el agente de unión es un anticuerpo biespecifico, en donde el agente de unión es un agente de unión agonista, en donde el primer dominio de unión que se une a CD40 se selecciona de un primer grupo que consiste en:
- (a) la región determinante de complementariedad de cadena pesada HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2323, la HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2324 y la HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2325, y
- 10 la región determinante de complementariedad de cadena ligera LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2326, la LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2327 y la LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2328; y
- (b) el dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2321 y el dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2322; y
- 15 en donde el segundo dominio de unión que se une a 4-1BB (CD137) se selecciona de un segundo grupo que consiste en:
- (a) la región determinante de complementariedad de cadena pesada HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2299, la HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2298 y la HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2299, y
- 20 la región determinante de complementariedad de cadena ligera LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2300, la LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2301 y la LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2302;
- (b) el dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2241 y el dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2242;
- 25 (c) la región determinante de complementariedad de cadena pesada HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2257, la HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2256 y la HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2257, y
- la región determinante de complementariedad de cadena ligera LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2258, la LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2259 y la LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2260;
- 30 (d) el dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2227 y el dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2228;
- (e) la región determinante de complementariedad de cadena pesada HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2315, la HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2316 y la HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2317, y
- 35 la región determinante de complementariedad de cadena ligera LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2318, la LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2319 y la LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2320; y
- (f) el dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2247 y el dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2248;
- 40 en donde los anticuerpos monoespecíficos parentales que comprenden dichos dominios de unión no muestran actividad agonista.
2. El agente de unión de la reivindicación 1, en donde el agente de unión está en el formato de un anticuerpo de longitud completa.
- 45 3. Una molécula de ácido nucleico que codifica un agente de unión de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde, preferiblemente, la molécula de ácido nucleico está contenida en un vector.
4. Una célula huésped aislada que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3.

5. Una composición farmacéutica que comprende, como agente activo, un agente de unión de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3 o una célula de acuerdo con la reivindicación 4.
- 5 6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
7. Un kit que comprende un agente de unión de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, una célula de acuerdo con la reivindicación 4 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 o 6.
- 10 8. Un agente de unión de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, una célula de acuerdo con la reivindicación 4 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 para uso como un medicamento.
- 15 9. Un agente de unión de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, una célula de acuerdo con la reivindicación 4 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, trastornos autoinmunes, enfermedades degenerativas y rechazos de trasplantes.

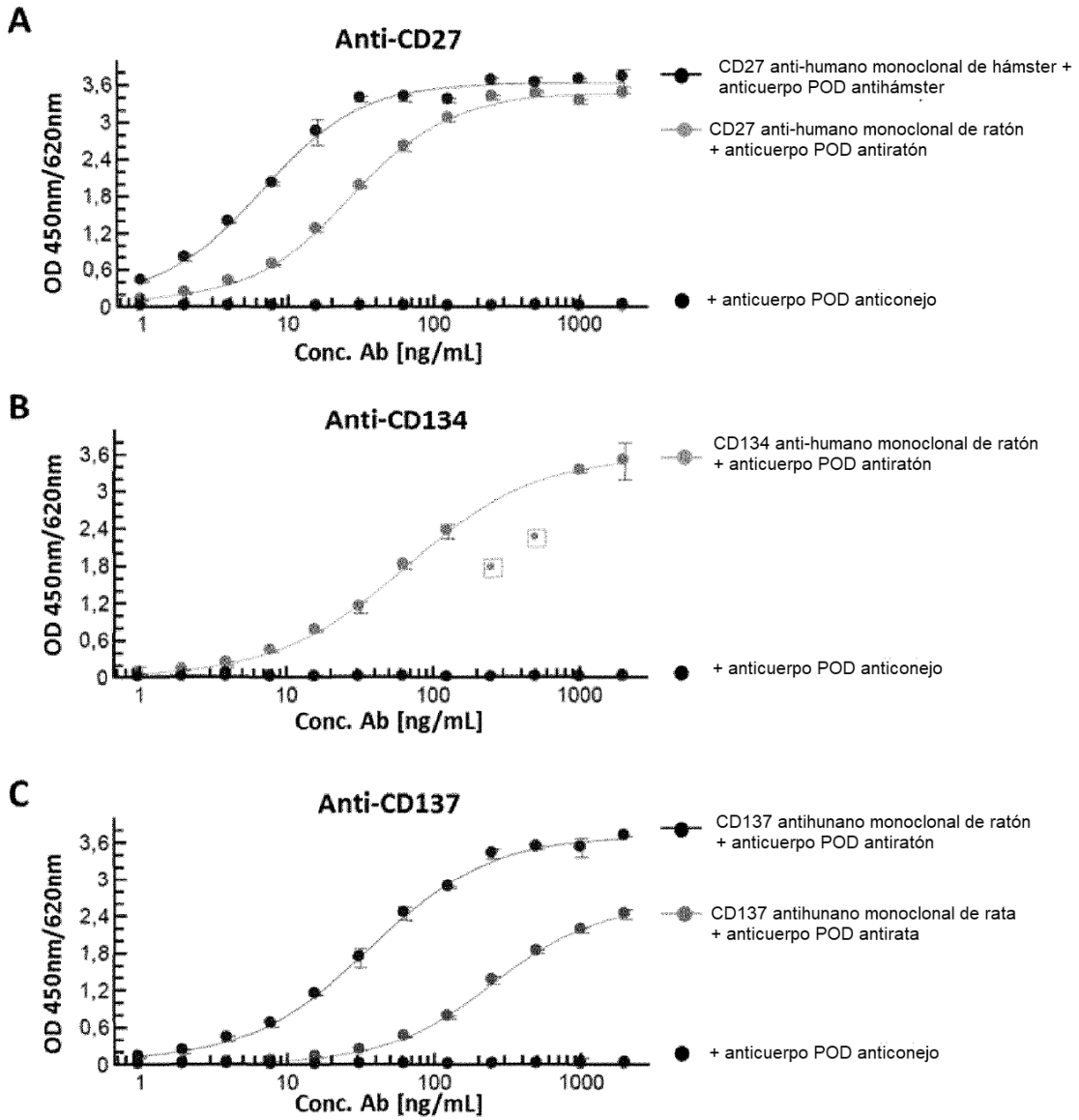


FIG. 1

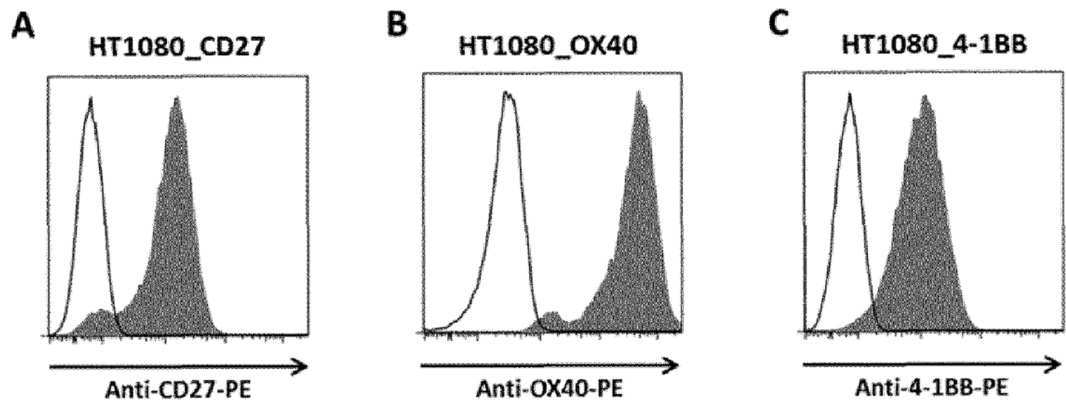


FIG. 2

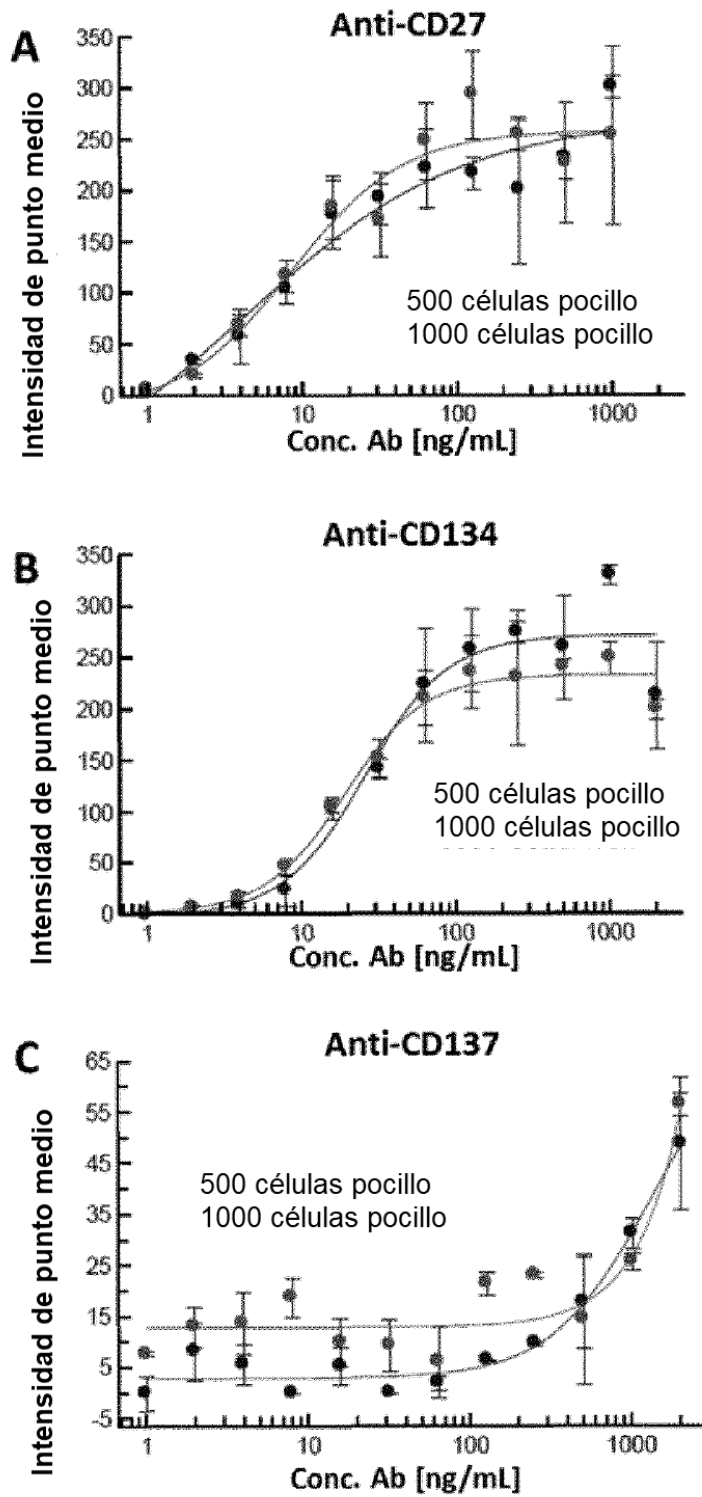


FIG. 3

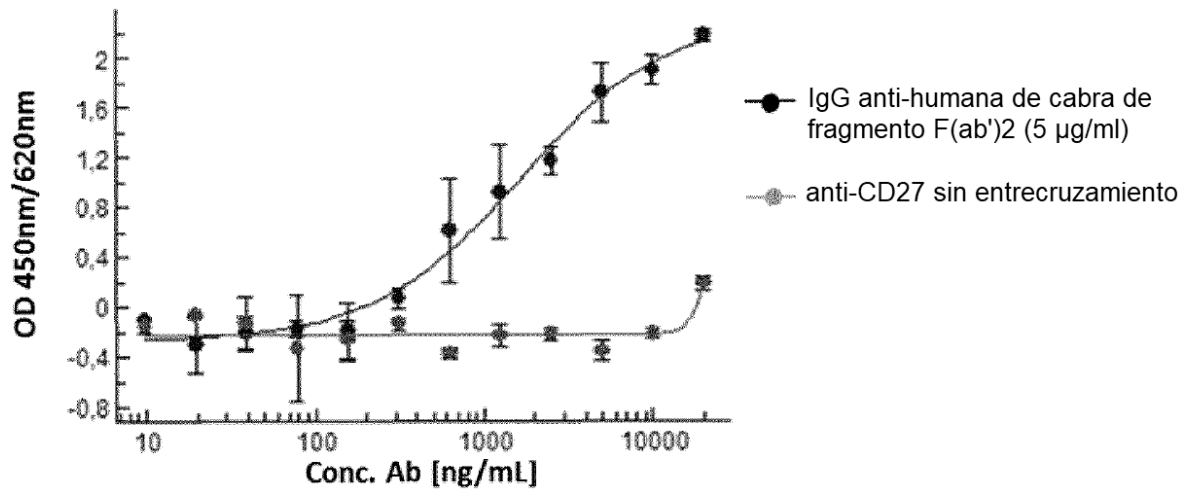


FIG. 4

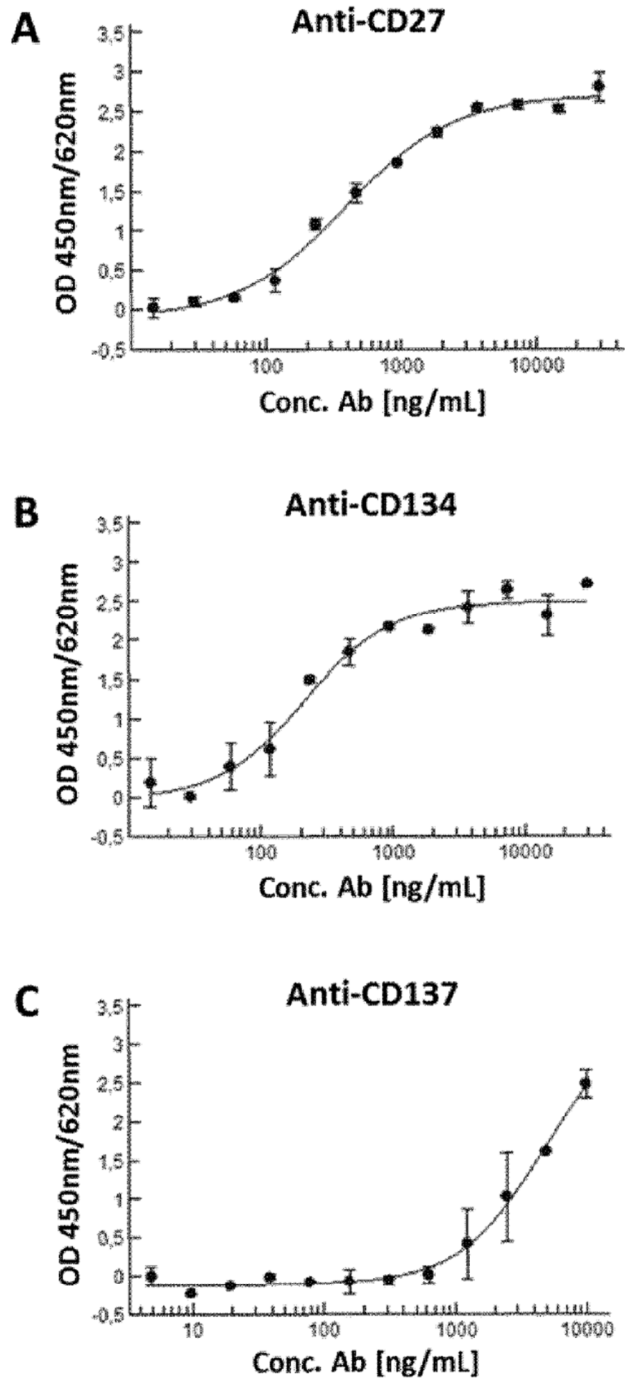
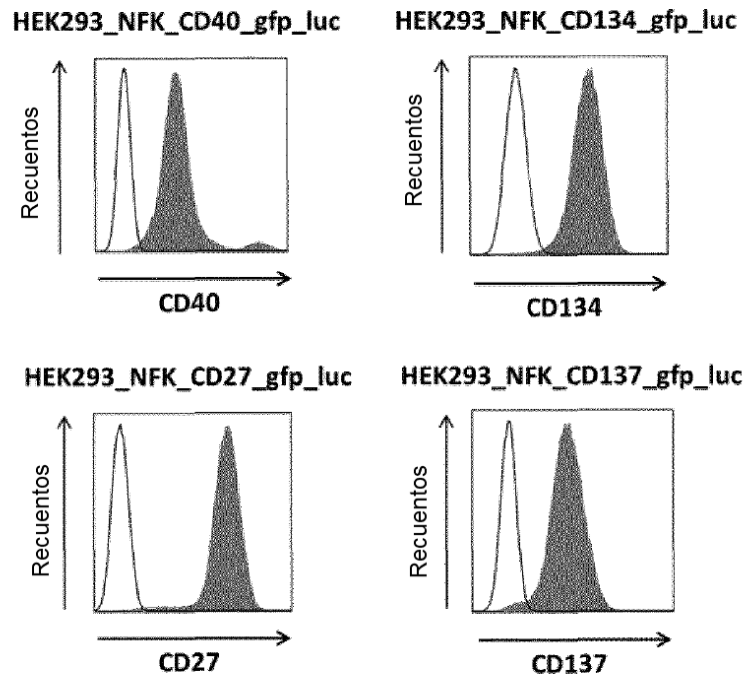


FIG. 5

A



B

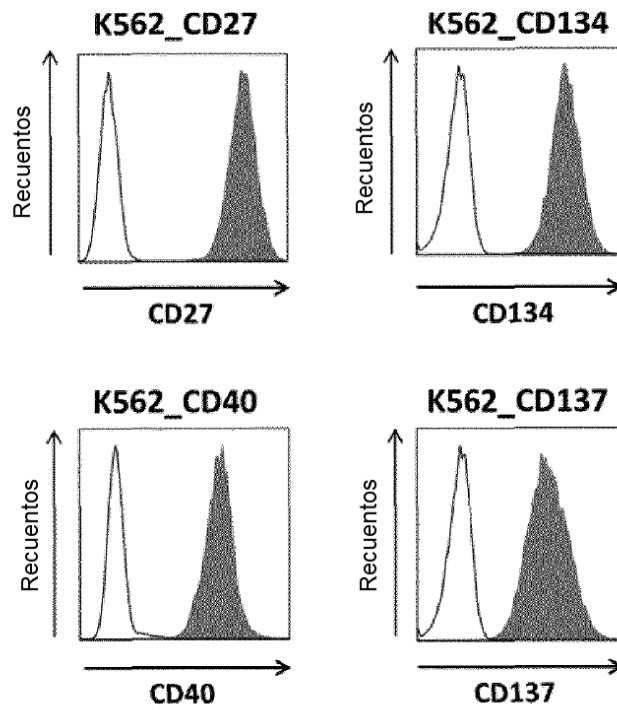


FIG. 6

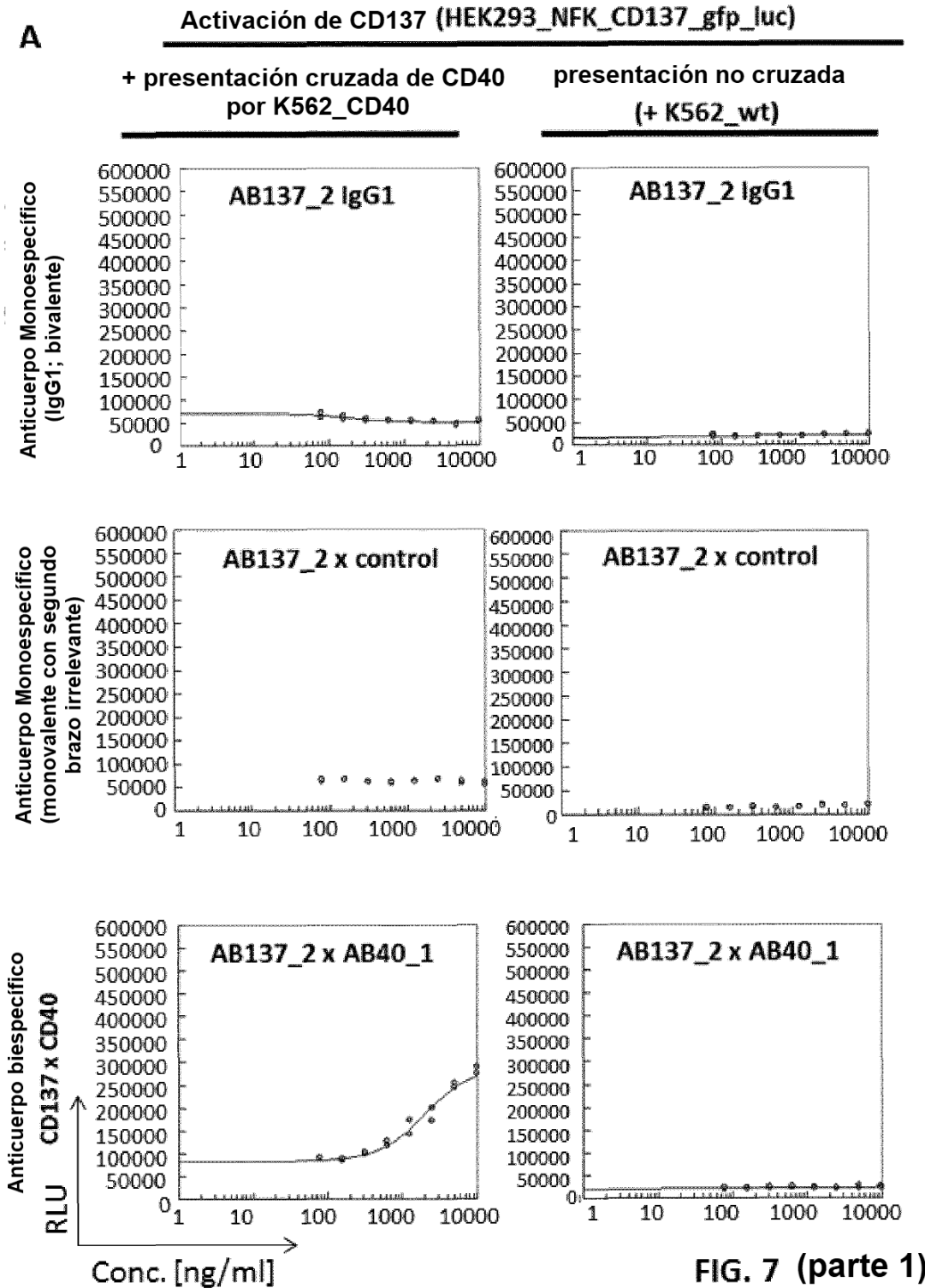


FIG. 7 (parte 1)

A Activación de CD40 (HEK293_NFK_CD40_gfp_luc)

+ presentación cruzada de CD137 por K562_CD137 **sin presentación cruzada (+ K562_wt)**

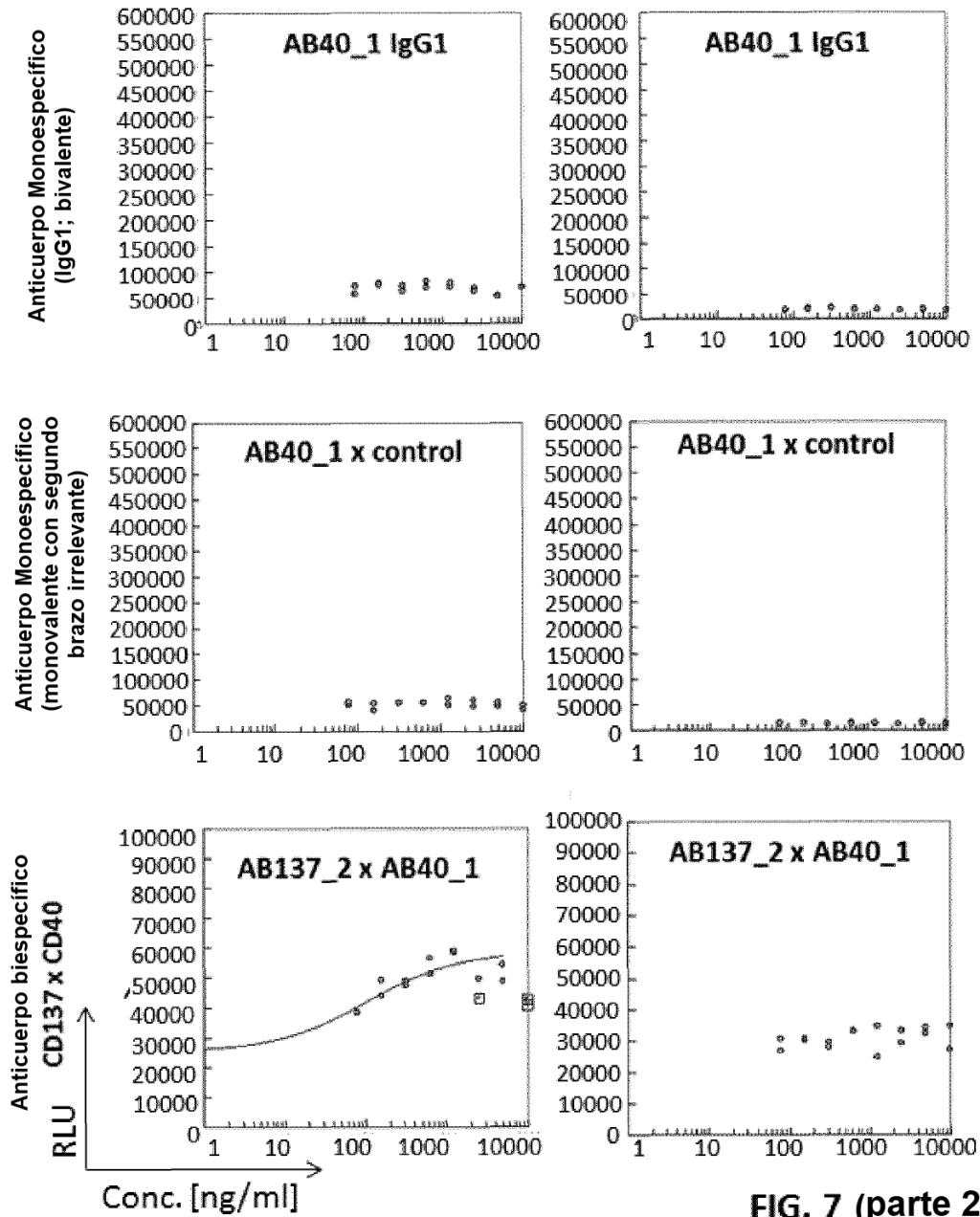


FIG. 7 (parte 2)

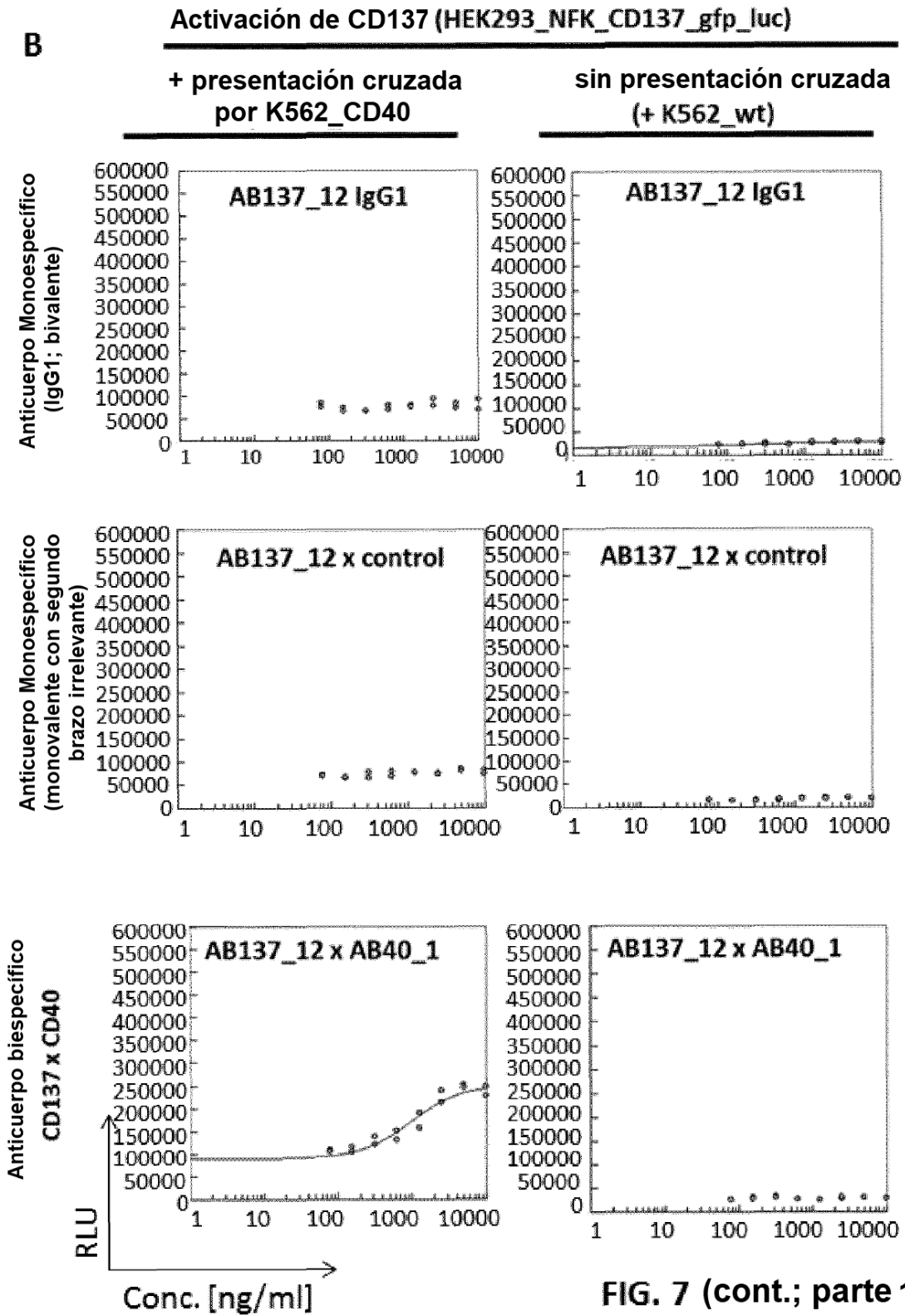
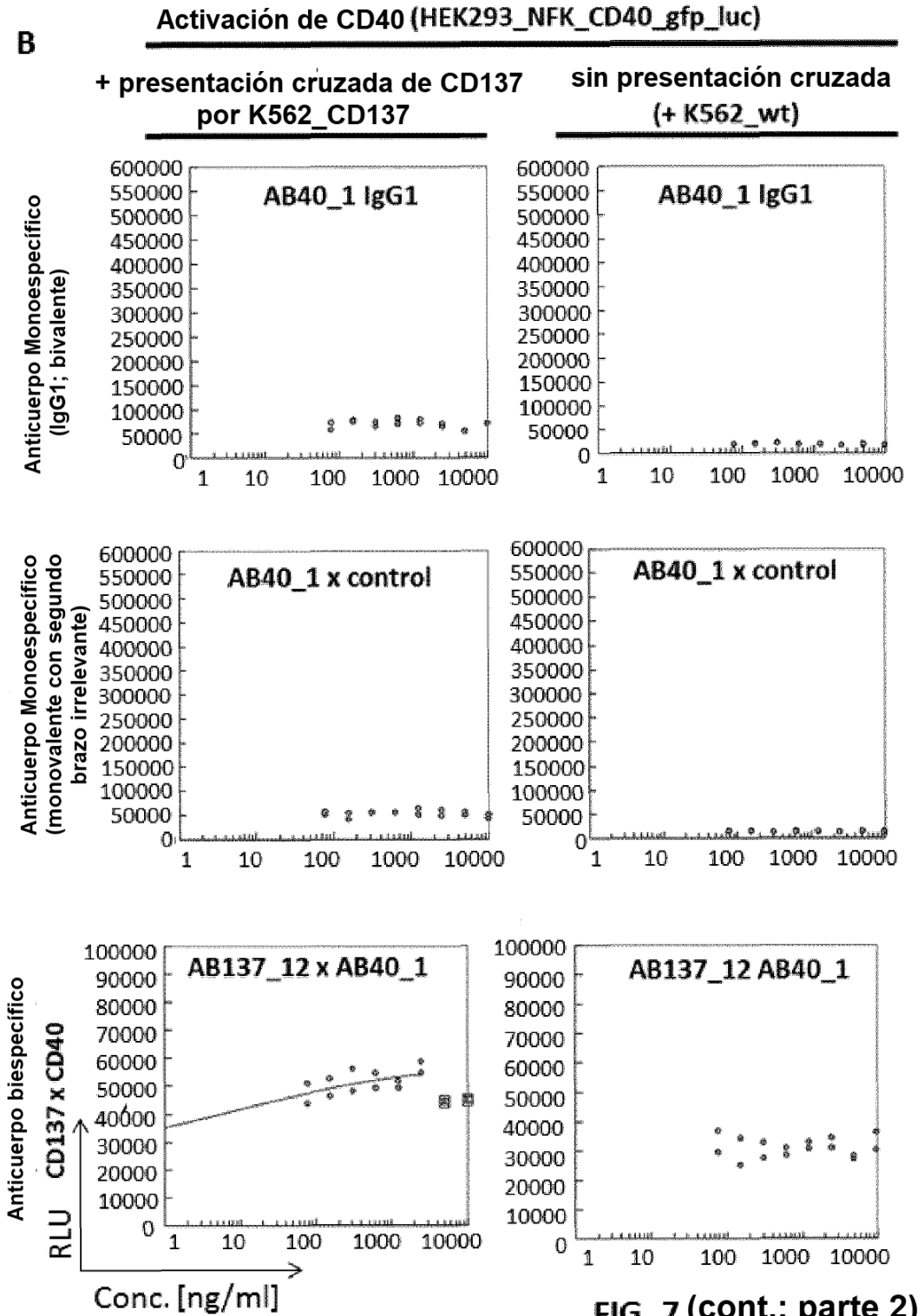


FIG. 7 (cont.; parte 1)



Activación de CD27 (HEK293_NFK_CD27_gfp_luc)

**+ presentación cruzada de CD40
por K562_CD40**

**sin presentación cruzada
(+ K562_wt)**

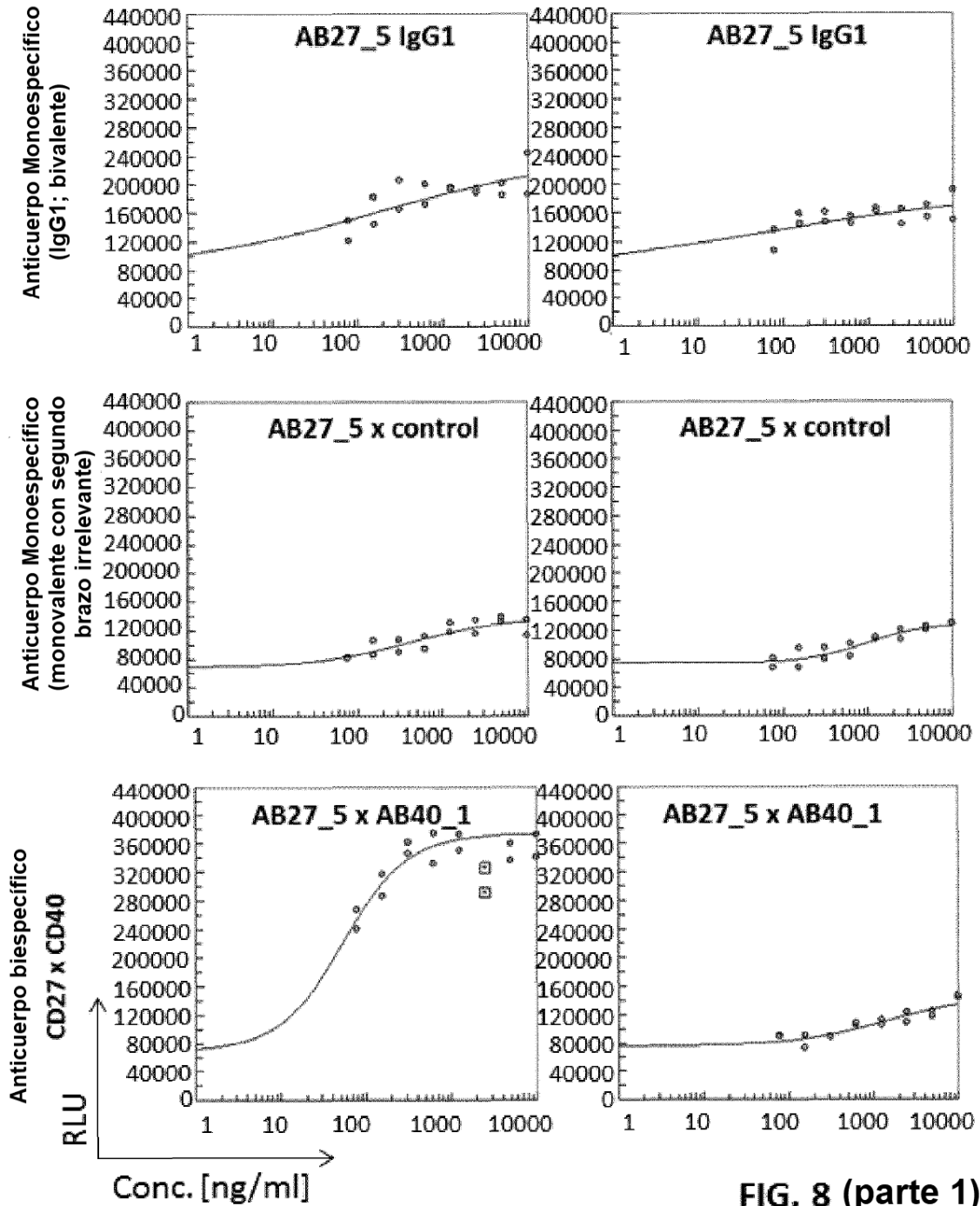


FIG. 8 (parte 1)

Activación de CD40 (HEK293_NFK_CD40_gfp_luc)

+ presentación cruzada de CD27 por K562_CD27 **sin presentación cruzada (+ K562_wt)**

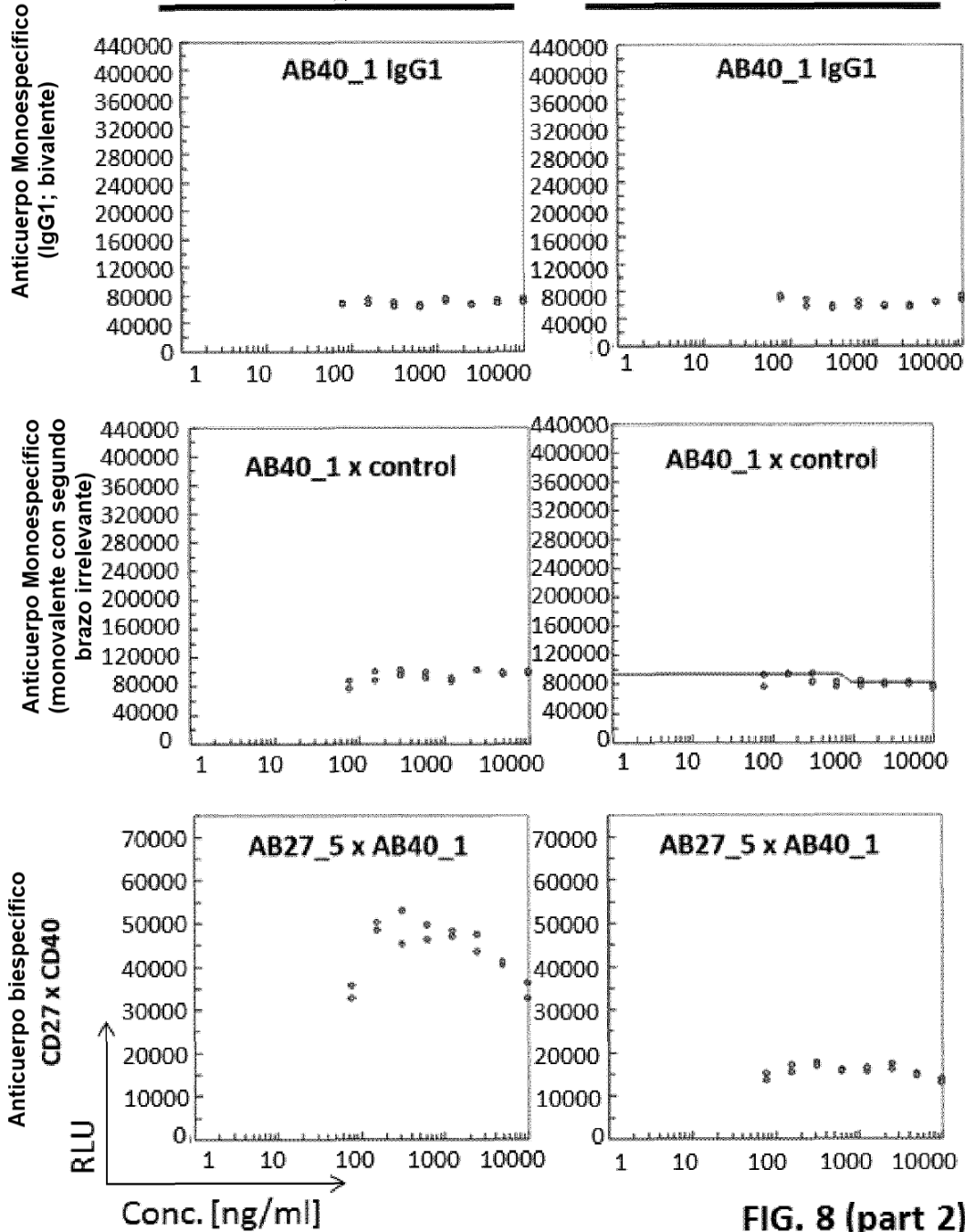
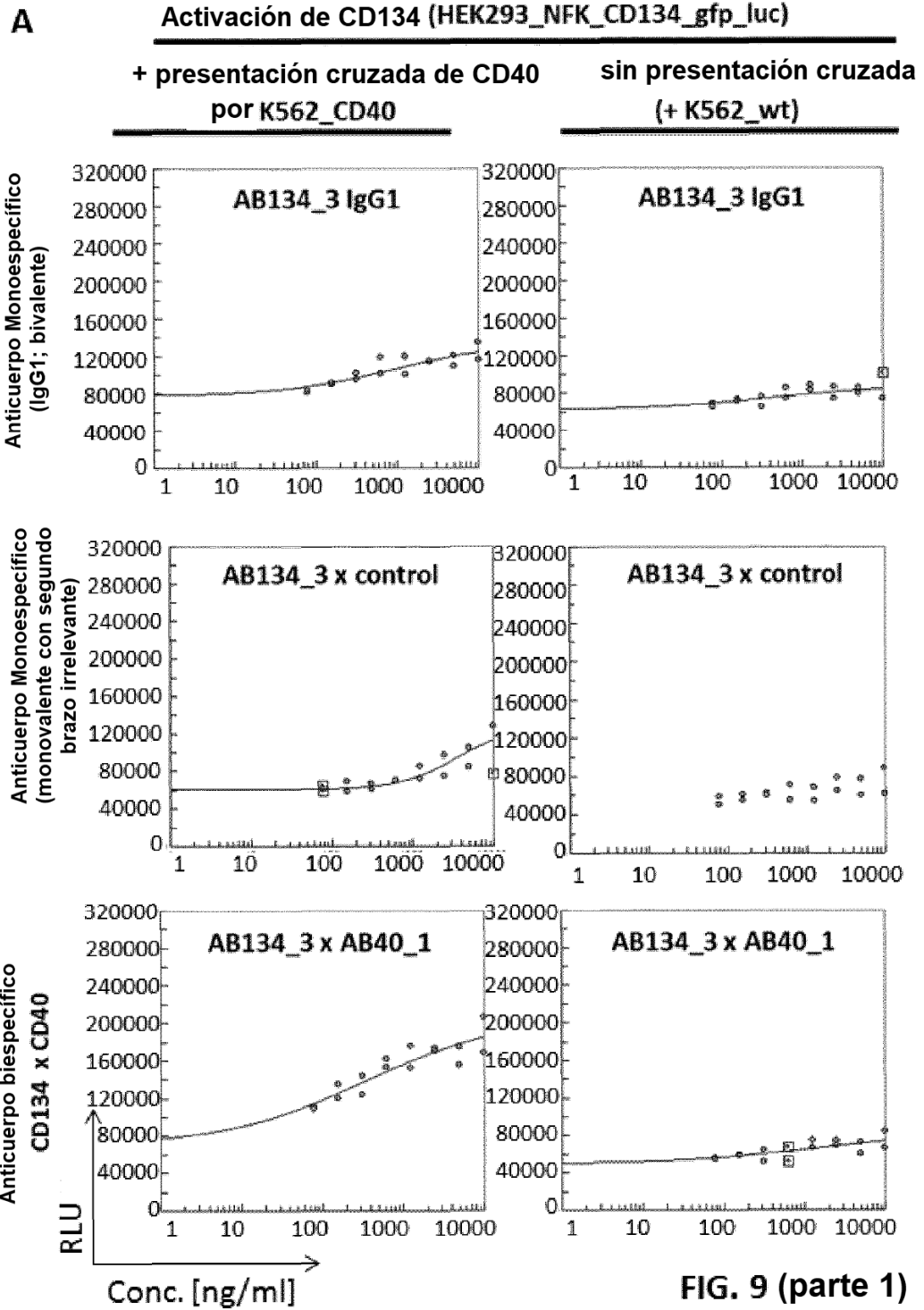


FIG. 8 (part 2)



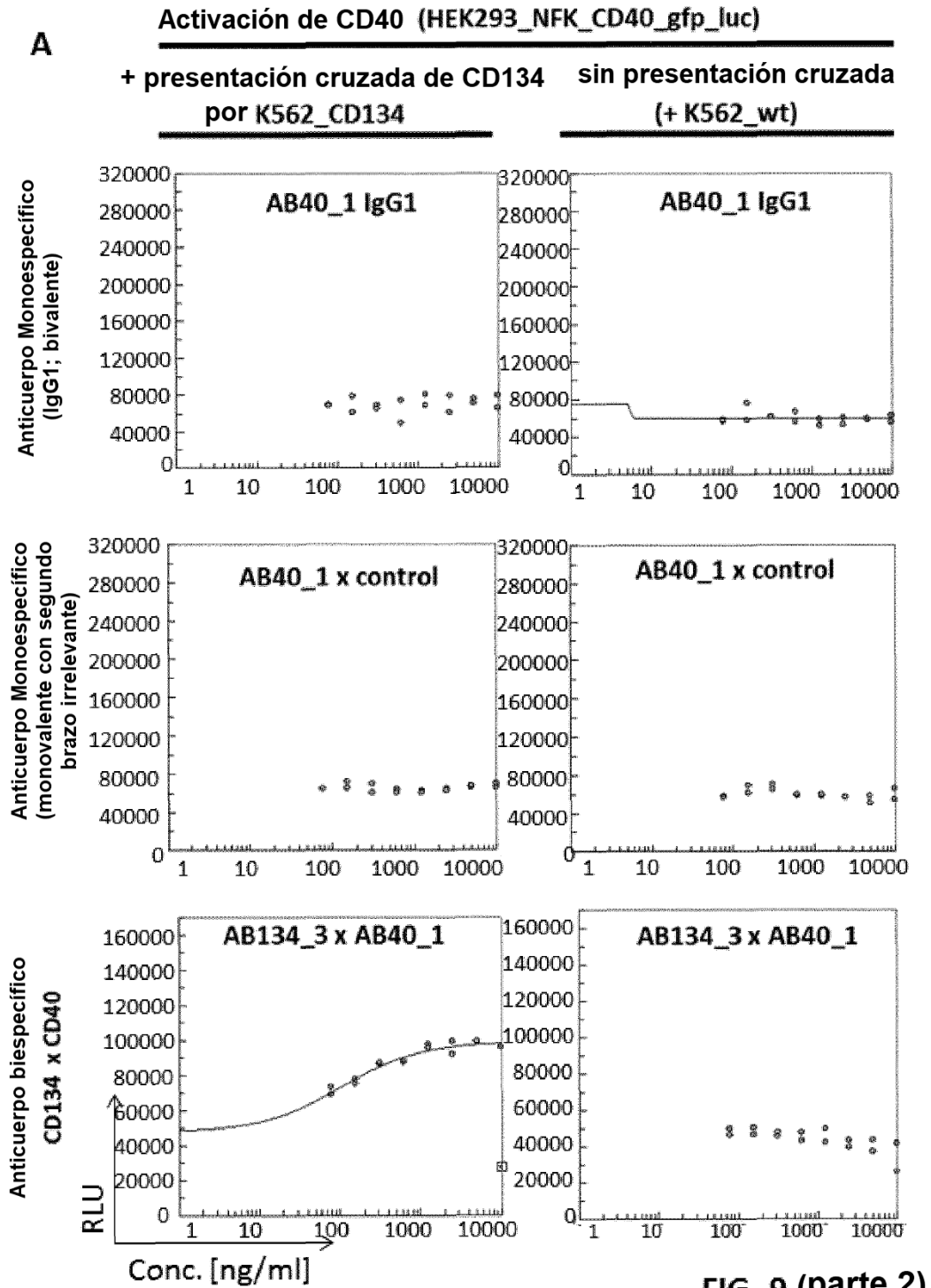


FIG. 9 (parte 2)

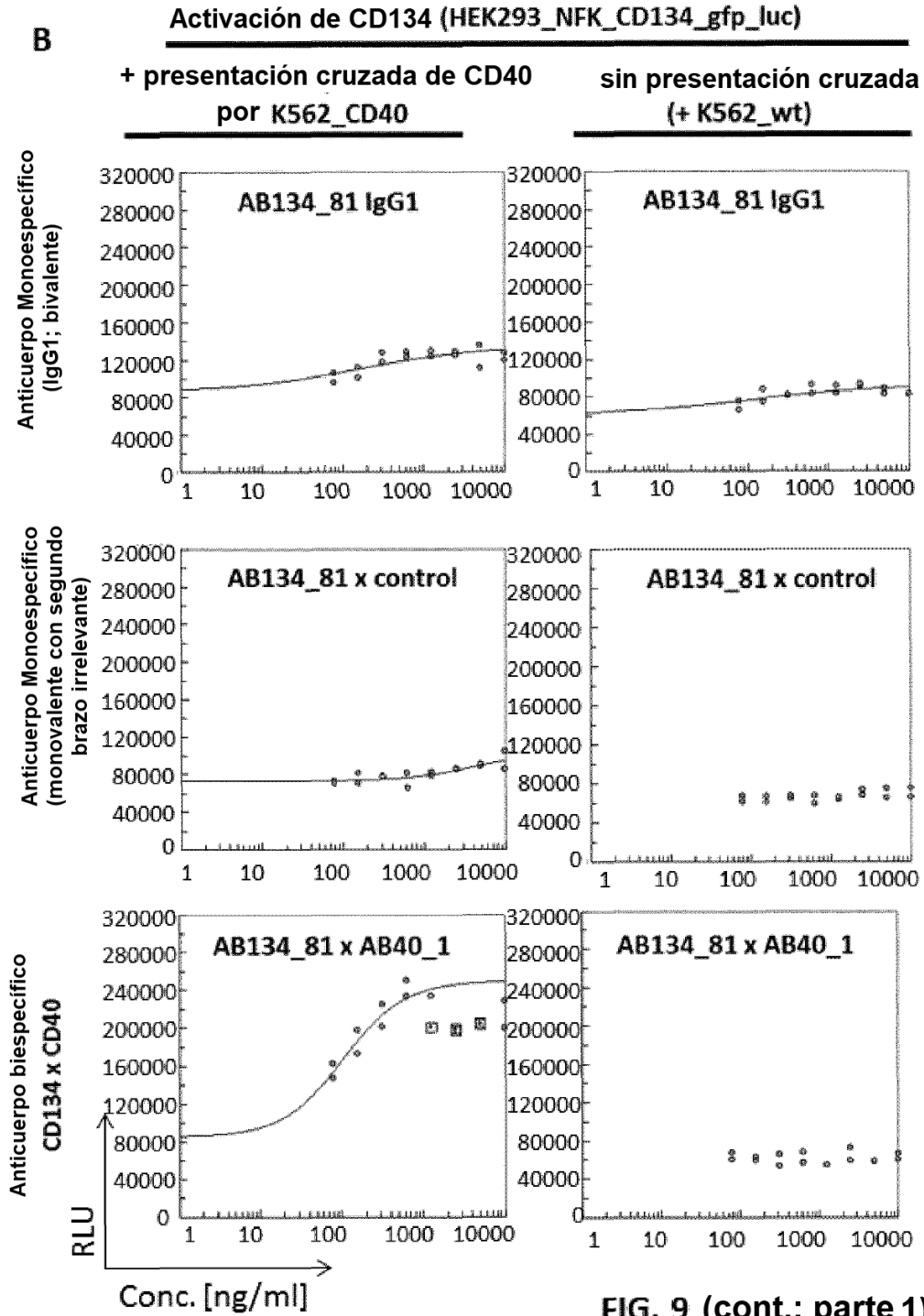


FIG. 9 (cont.; parte 1)

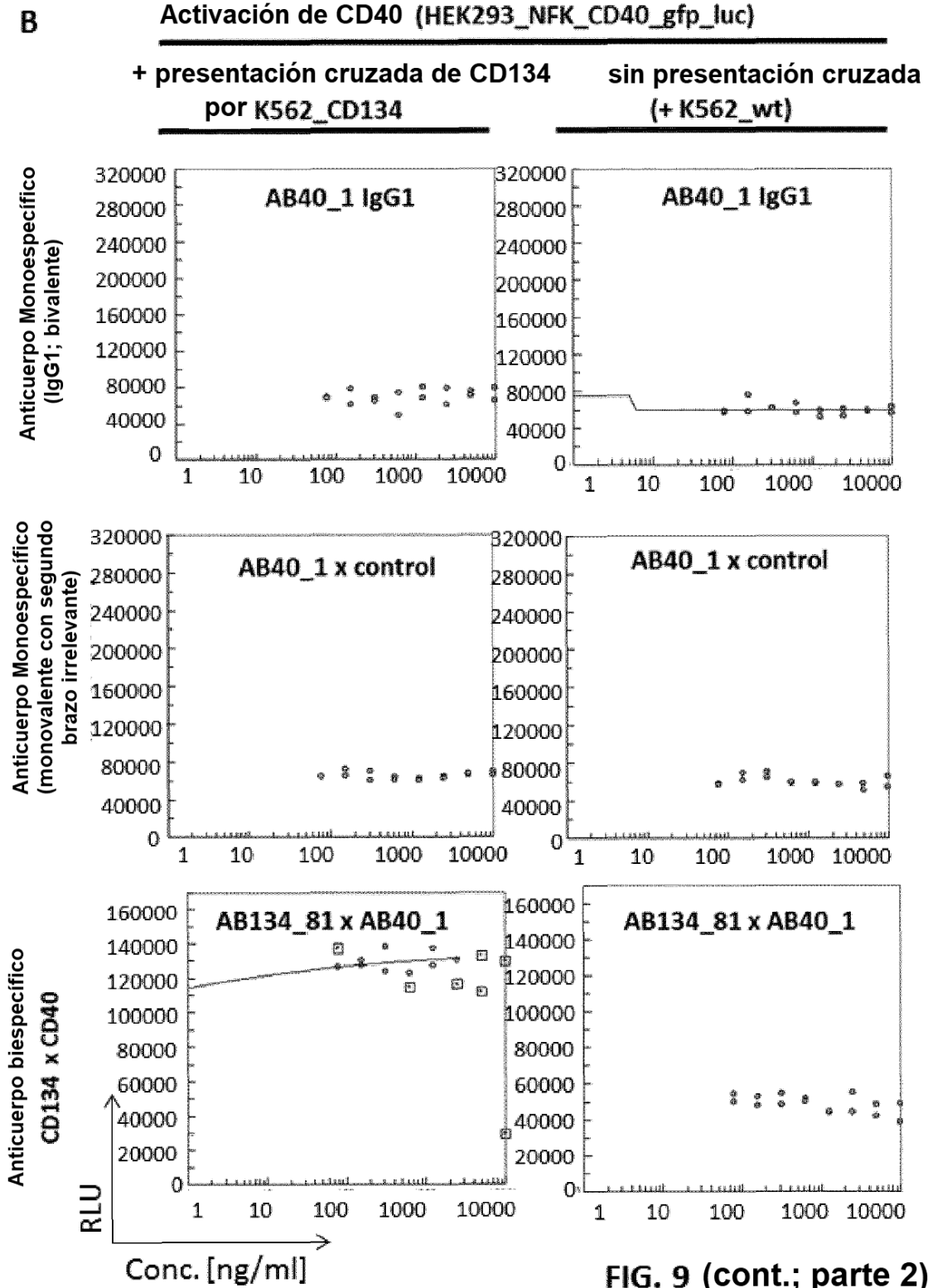


FIG. 9 (cont.; parte 2)

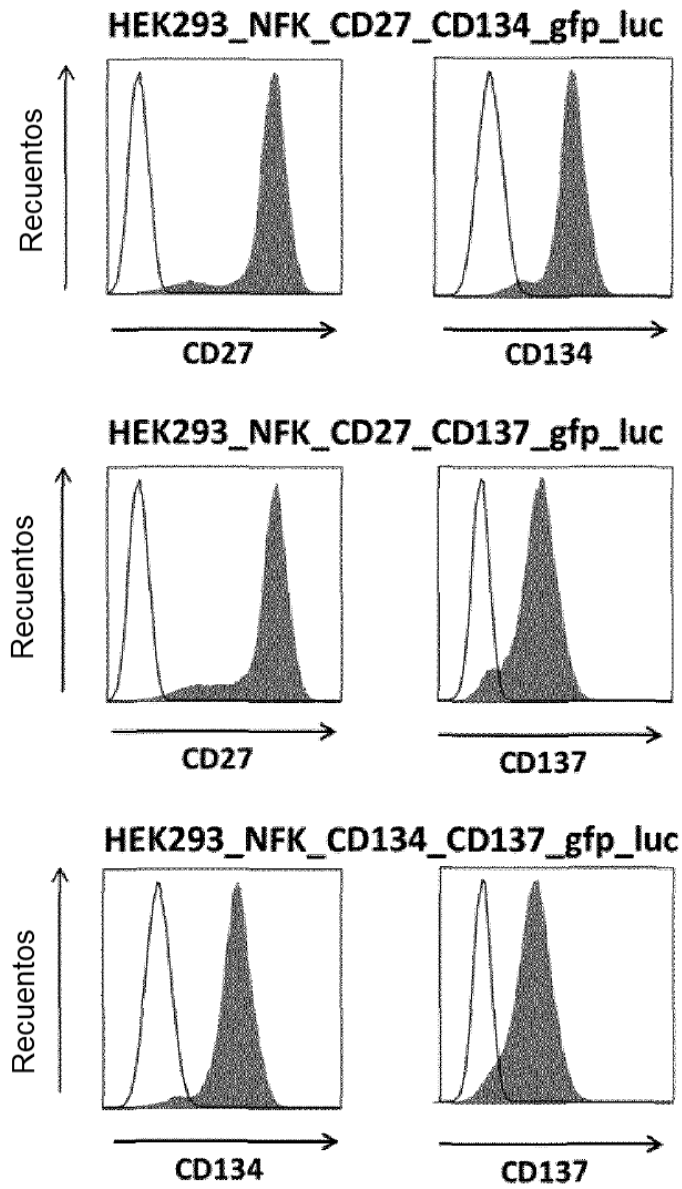


FIG. 10

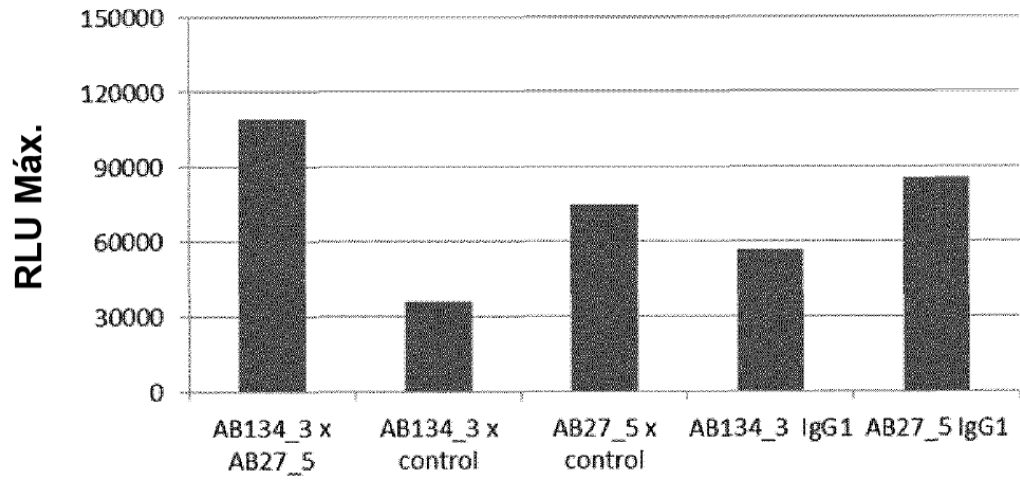
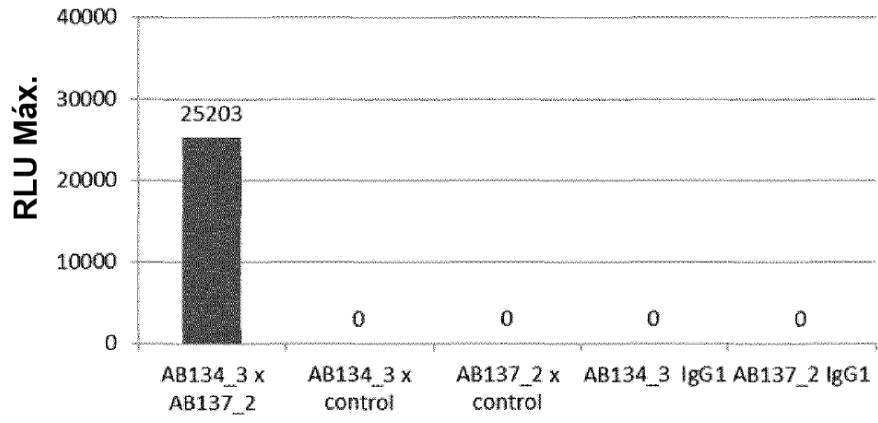


FIG. 11

A



B

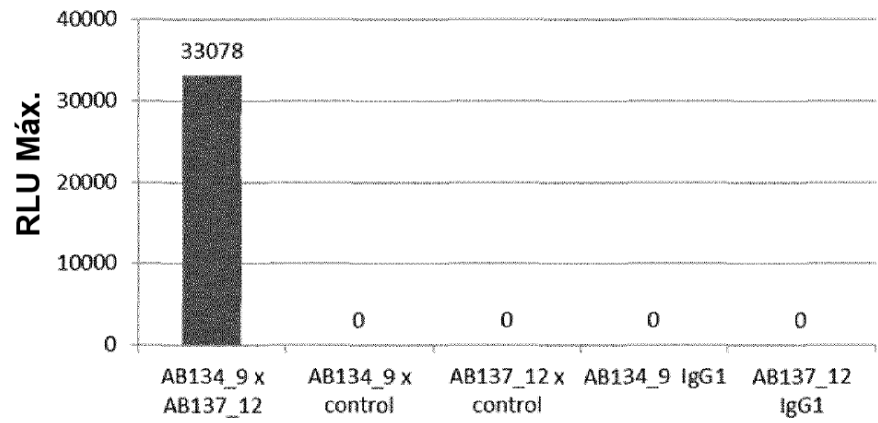
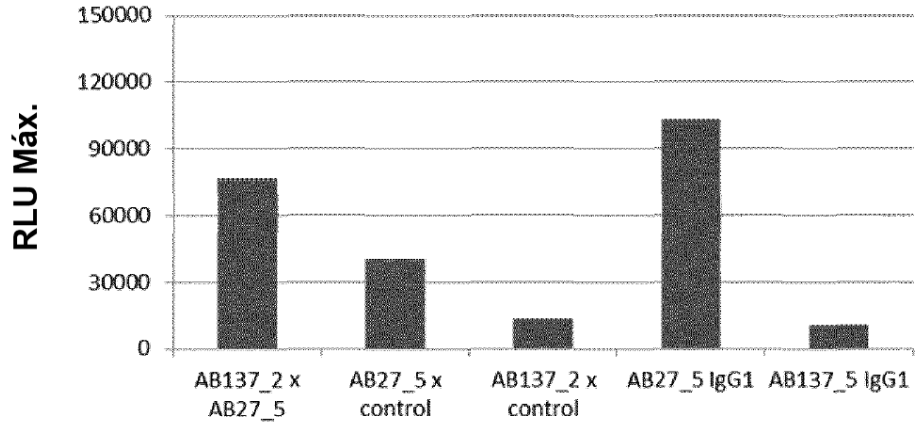


FIG. 12

A



B

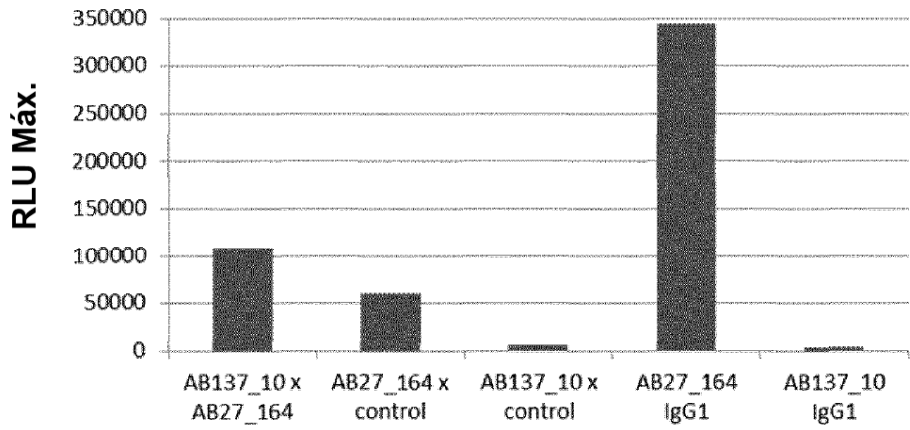


FIG. 13