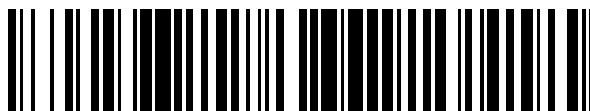


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 898**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2015 PCT/US2015/023432**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15153513**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2015 E 15716335 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 3126394**

54 Título: **Anticuerpos anti-OX40 y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

**31.03.2014 US 201461973193 P**  
**06.05.2014 US 201461989448 P**  
**31.10.2014 US 201462073873 P**  
**14.11.2014 US 201462080171 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.06.2020**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**DU, CHANGCHUN;**  
**KIM, JEONG;**  
**ZHU, JING;**  
**BEVERS, JACK III;**  
**WALSH, KEVIN;**  
**DE ALMEIDA, PATRICIA;**  
**ANDYA, JAMES y**  
**SHEN, YE**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 763 898 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Anticuerpos anti-OX40 y procedimientos de uso

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-OX40 y a procedimientos de uso de los mismos.

10 **ANTECEDENTES**

10 OX40 (también conocido como CD34, TNFRSF4 y ACT35) es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral. OX40 no se expresa de forma constitutiva en los linfocitos T indiferenciados, pero se induce después del acoplamiento del receptor de linfocitos T (TCR). El ligando para OX40, OX40L, se expresa de forma predominante en células presentadoras de antígeno. OX40 está altamente expresado por los linfocitos T CD4+ 15 activados, los linfocitos T CD8+ activados, los linfocitos T de memoria y los linfocitos T reguladores. La señalización por OX40 puede proporcionar señales coestimuladoras a los linfocitos T CD4 y CD8, lo que da lugar a una proliferación, supervivencia, función efectora y migración celulares potenciadas. La señalización por OX40 también potencia el desarrollo y la función de los linfocitos T de memoria.

20 Los linfocitos T reguladores (Treg) están altamente enriquecidos en tumores y en ganglios linfáticos de drenaje de tumores derivados de múltiples indicaciones de cáncer, incluyendo melanoma, CPNM, cáncer renal, de ovario, de colon, pancreático, hepatocelular y de mama. En un subconjunto de estas indicaciones, las densidades de linfocitos Treg intratumorales incrementadas se asocian con un mal pronóstico del paciente, lo que sugiere que estas células desempeñan un papel importante en la supresión de la inmunidad antitumoral. Se han descrito linfocitos infiltrantes de 25 tumor positivos para OX40.

El documento WO 2009/079335 divulga el anticuerpo frente a OX40 agonista 11D4, que se une con alta afinidad al dominio extracelular del OX40R y en linfocitos T completos. Se describen dos anticuerpos agonistas, 1F7 y 2G2, en Xie *et al.*, Tissue Antigens 2006, 67(4), 307-317. Se puede encontrar un grupo de scFv frente a OX40 agonistas en el 30 documento WO 03/106498. Se describen los anticuerpos frente a OX40 119-122 y 106-122 y su actividad biológica en Voo *et al.*, Journal of Immunology 2013, 191(7), 3641-3650.

Se describe la administración de un anticuerpo frente a OX40 agonista 9B12 a pacientes con neoplasias malignas sólidas en Curti *et al.*, Cancer Research 2013, 73(24), 7189-7198, y se divulga el uso de un anticuerpo frente a OX40 35 agonista en combinación con un antagonista de PD-1 en Guo *et al.*, PLOS ONE 2014, 9(2), e89350.

Está claro que sigue existiendo la necesidad de obtener agentes que tengan atributos clínicos que sean óptimos para el desarrollo como agentes terapéuticos. La invención descrita en el presente documento satisface esta necesidad y 40 proporciona otros beneficios.

40 **SUMARIO**

En un aspecto, se proporcionan anticuerpos aislados que se unen a OX40 humano que comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 y un dominio 45 variable de la cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57.

En algunos modos de realización, estos anticuerpos disminuyen los linfocitos T efectores CD4+. En algunos modos de realización, estos anticuerpos disminuyen los linfocitos T reguladores (Treg). En algunos modos de realización, la 50 disminución es por ADCC y/o fagocitosis. En algunos modos de realización, la disminución es por ADCC.

En otro aspecto, se proporcionan anticuerpos agonistas anti-OX40 humano que se unen a OX40 humano con una afinidad de menos de o igual a aproximadamente 0,45 nM como se determina usando radioinmunoanálisis. En algunos 55 modos de realización, el anticuerpo se une a OX40 humano y a OX40 de macaco cangrejero. En algunos modos de realización, la unión a OX40 humano y de macaco cangrejero se determina usando un ensayo por FACS. En algunos modos de realización, la unión a OX40 humano tiene una CE<sub>50</sub> de menos de o igual a 0,3 µg/ml o menor. En algunos modos de realización, la unión a OX40 de macaco cangrejero tiene una CE<sub>50</sub> de menos de o igual a 1,5 µg/ml. En algunos modos de realización, la unión a OX40 de macaco cangrejero tiene una CE<sub>50</sub> de menos de o igual a 1,4 µg/ml.

En otro aspecto, se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican cualquiera de los anticuerpos anti-OX40 humano (por ejemplo, anticuerpos agonistas) proporcionados en el presente documento. 60

En otro aspecto, se proporcionan células huésped que comprenden el ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-OX40 humano (por ejemplo, anticuerpos agonistas) proporcionados en el presente documento.

65 En otro aspecto, se proporcionan procedimientos de producción de un anticuerpo que comprenden cultivar la célula huésped de modo que se produzca el anticuerpo. En algunos modos de realización, los procedimientos comprenden

además recuperar el anticuerpo de la célula huésped.

En otro aspecto, se proporcionan inmunoconjugados que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-OX40 humano (por ejemplo, anticuerpos agonistas) proporcionados en el presente documento y un agente citotóxico.

En otro aspecto, se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-OX40 humano (por ejemplo, anticuerpos agonistas) proporcionados en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos modos de realización, la formulación farmacéutica comprende (a) cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano descritos en el presente documento a una concentración de entre aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, (b) un polisorbato, en la que la concentración de polisorbato es de aproximadamente un 0,02 % a aproximadamente un 0,06 %; (c) un tampón histidina a de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,0; y (d) un sacárido, en la que la concentración de sacárido es de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 320 mM.

En otro aspecto, un anticuerpo agonista anti-OX0 humano proporcionado en el presente documento es para su uso como un medicamento.

En otro aspecto, un anticuerpo agonista anti-OX0 humano proporcionado en el presente documento es para su uso en el tratamiento del cáncer.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista anti-OX0 humano para su uso en procedimientos de tratamiento de un individuo que tiene cáncer que comprenden administrar al individuo una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano proporcionados en el presente documento. En algunos modos de realización, los procedimientos comprenden además administrar un agente terapéutico adicional. En algunos modos de realización, el agente terapéutico adicional comprende un agente quimioterápico. En algunos modos de realización, el agente terapéutico adicional comprende un antagonista de unión al eje de PD-1.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIG. 1:** se analizaron variantes de anticuerpo frente a OX40 humanizado por FACS para evaluar la unión del anticuerpo a huOX40 expresado en la superficie de células Hut78.

**FIG. 2:** anticuerpo agonista frente a OX40 1A7.gr.1 unido con alta afinidad a los linfocitos T humanos y de macaco cangrejero.

**FIGS. 3A y 3B:** (**FIG. 3A**) el mab 1A7.gr.1 no tuvo ningún efecto sobre la proliferación de linfocitos T en ausencia de reticulación. La concentración creciente de mab 1A7.gr.1 coestimuló la proliferación de linfocitos T de memoria CD4+ en respuesta a la reticulación de anti-CD3. La CE<sub>50</sub> calculada para el efecto coestimulador de mab1A7.gr.1 fue de 9,96 ng/ml (n=2). (**FIG. 3B**) Las concentraciones crecientes de mab 1A7.gr.1 coestimularon la producción de linfocitos T de memoria CD4+ de interferón gamma en respuesta a la reticulación de anti-CD3.

**FIG. 4A:** en presencia de anti-CD3 unido a placa, mab 1A7 unido a placa coestimuló la proliferación de linfocitos T efectoras. Por el contrario, se anuló la actividad coestimuladora cuando se proporcionó mab 1A7 en forma soluble en presencia de anti-CD3 unido a placa, a un nivel similar al observado con un anticuerpo control de isotipo unido a placa en presencia de anti-CD3 unido a placa.

**FIG. 4B:** el mAb 1A7 gr.1, que albergaba la mutación N297G, no coestimuló la proliferación de linfocitos Tef. Por el contrario, mab 1A7 gr.1 natural (no mutado) coestimuló la proliferación de linfocitos Tef inducida por anti-CD3.

**FIG. 5:** el tratamiento con el anticuerpo agonista frente a OX40 inhibió la supresión mediada por linfocitos Treg de linfocitos T CD4+ indiferenciados. Se inhibieron los linfocitos T CD4+ indiferenciados (T<sub>h</sub>) cuando se cultivaron solos por la adición de linfocitos Treg y un anticuerpo control de isotipo. Se anuló la inhibición mediada por linfocitos Treg de la proliferación de linfocitos T CD4+ naturales en cultivos que contenían anticuerpo anti-OX40, mab 1A7.gr1. Los datos representaron el promedio de 3 experimentos independientes.

**FIG. 6:** el tratamiento con mab 1A7.gr.1 alteró la función supresora de los linfocitos Treg.

**FIGS. 7A y 7B:** (**FIG. 7A**) el tratamiento con mab 1A7.gr.1 indujo la ADCC de linfocitos T que expresaban OX40. (**FIG. 7B**) El tratamiento con mab A7.gr1 (IgG1) indujo una mayor ADCC de linfocitos T CD4+ que expresaban OX40 en comparación con el nivel de ADCC inducida por mab 1A7.gr1 (IgG4).

**FIGS. 8A y 8B:** los clones transgénicos para OX40 humano de BT474 expresaron diferentes niveles de OX40 humano. **FIG. 8A**, células BT474 de baja expresión de OX40. **FIG. 8B**, células BT474 de alta expresión de OX40.

**FIG. 9:** el tratamiento con anticuerpo agonista frente a OX40 indujo la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos de las líneas celulares que expresaban OX40 humano, y el nivel de fagocitosis celular dependiente de anticuerpos fue

sensible al nivel de expresión de OX40 en las células diana.

**FIG. 10:** el tratamiento con el anticuerpo agonista frente a OX40 1A7.gr1 indujo la ADCC en células que expresaban OX40.

**FIGS. 11A-I:** secuencias de aminoácidos de regiones variables de anticuerpos anti-OX40. Las secuencias de HVR-H1, -H2 y -H3 de la cadena pesada y HVR-L1, -L2 y -L3 de la cadena ligera están señaladas. Las posiciones de aminoácido están numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, como se describe en el presente documento.

**FIG. 12A:** mab anti-OX40 humano 1A7gr1 unido a células Hut78-hOX40 de una forma dependiente de la dosis, con un 70 % de unión máxima observada a aproximadamente 200 ng/ml de anticuerpo (indicado por el recuadrado punteado).

**FIG. 12B:** OX40L-flag demostró la unión dependiente de la dosis a células Hut78-hOX40.

**FIG. 12C:** la unión de mab anti-OX40 humano 1A7.gr.1 a células Hut78-hOX40 disminuyó a medida que se incrementaba la concentración de OX40L-flag.

**FIG. 12D:** la presencia de DR5-flag de control no tuvo ningún impacto sobre la unión a mab 1A7.gr.1.

**FIG. 13:** farmacocinética (FC) de 1A7.gr1 dosificado a 1 mg/kg o 10 mg/kg en ratones SCID.

**FIGS. 14A y 14B:** la administración de 1A7.gr1 en macacos cangrejeros dio como resultado incrementos mínimos o transitorios de la proteína C-reactiva (CRP). (**FIG. 14A**) Niveles de CRP con el tiempo observados en monos a los que se les administraron dosis de 0 mg/kg o 0,01 mg/kg. (**FIG. 14B**) Niveles de CRP con el tiempo observados en monos a los que se les administraron dosis de 0,3 mg/kg o 10 mg/kg.

**FIGS. 15A y 15B:** la administración de 1A7.gr1 en macacos cangrejeros dio como resultado incrementos mínimos o transitorios de un subconjunto mixto de citocinas. (**FIG. 15A**) Niveles de citocinas proinflamatorias IL6 y MCP1 con el tiempo. (**FIG. 15B**) Niveles de citocinas antiinflamatorias IL10 e IL1ra con el tiempo. En las **FIGS. 15A y 15B**, los monos individuales en el grupo de dosis de 10 mg/kg que demostraron incrementos transitorios de los niveles de citocinas están marcados con flechas.

**FIGS. 16A y 16B:** se confirmó la exposición de macacos cangrejeros a 1A7.gr1 por FC en suero y ocupación periférica del receptor. (**FIG. 16A**) FC en suero de monos a los que se les administraron 0,01, 0,3 o 10 mg/kg de 1A7.gr1. (**FIG. 16B**) Ocupación del receptor OX40 en linfocitos T CD4+ periféricos con el tiempo en monos a los que se les administraron 0,01, 0,3 o 10 mg/kg de 1A7.gr1.

**FIG. 17:** farmacocinética (FC) de 1A7.gr1 dosificado a 0,5, 5 o 30 mg/kg en macacos cangrejeros.

**FIG. 18:** ocupación del receptor OX40 con el tiempo en monos a los que se les administraron 0, 0,5, 5 o 30 mg/kg de 1A7.gr1. Las flechas indican los días en los que se obtuvieron las muestras.

**FIG. 19:** niveles de MCP-1 con el tiempo en monos a los que se les administraron 0, 0,5, 5 o 30 mg/kg de 1A7.gr1.

**FIG. 20:** no se observó ninguna activación o proliferación significativa de linfocitos T periféricos en monos a los que se les administraron 0, 0,5, 5 o 30 mg/kg de 1A7.gr1.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

### I. DEFINICIONES

El término "disfunción", en el contexto de la disfunción inmunitaria, se refiere a un estado de sensibilidad inmunitaria reducida a la estimulación antigénica.

El término "disfuncional", como se usa en el presente documento, también incluye resistente o insensible al reconocimiento antigénico, específicamente, la capacidad alterada de traducir el reconocimiento antigénico en funciones efectoras de linfocitos T en dirección 3, tales como proliferación, producción de citocinas (por ejemplo, interferón gamma) y/o destrucción de células diana.

"Potenciar la función de los linfocitos T" significa inducir, provocar o estimular un linfocito T efector o de memoria para que tenga una función biológica renovada, prolongada o amplificada. Los ejemplos de potenciación de la función de los linfocitos T incluyen: segregación incrementada de interferón y de los linfocitos T efectores CD8+, segregación incrementada de interferón y de los linfocitos T de memoria y/o efectores CD4+, proliferación incrementada de linfocitos T efectores y/o de memoria CD4+, proliferación incrementada de linfocitos T efectores CD8+, sensibilidad al antígeno

incrementada (por ejemplo, eliminación), con respecto a dichos niveles antes de la intervención. En un aspecto, el nivel de potenciación es de al menos un 50 %, de forma alternativa de un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 150 %, 200 %. La manera de medir esta potenciación es conocida por un experto en la técnica.

5 La "inmunidad tumoral" se refiere al proceso en el que los tumores evaden el reconocimiento y la eliminación inmunitarios. Por tanto, como concepto terapéutico, se "trata" la inmunidad tumoral cuando se atenúa dicha evasión y los tumores se reconocen y atacan por el sistema inmunitario. Los ejemplos de reconocimiento tumoral incluyen unión a tumor, reducción del volumen tumoral y eliminación tumoral.

10 "Inmunogenicidad" se refiere a la capacidad de una sustancia particular de provocar una respuesta inmunitaria. Los tumores son inmunógenos y la potenciación de la inmunogenicidad tumoral ayuda en la eliminación de las células tumorales por la respuesta inmunitaria.

15 Una "región estructural humana aceptora" para los propósitos en el presente documento es una región estructural que comprende la secuencia de aminoácidos de una región estructural del dominio variable de la cadena ligera (VL) o una región estructural del dominio variable de la cadena pesada (VH) derivada de una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana, como se define a continuación. Una región estructural humana aceptora "derivada de" una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunos aspectos, el número de cambios de aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunos aspectos, la región estructural humana aceptora de VL es idéntica en secuencia a la secuencia de la región estructural de inmunoglobulina humana de VL o la secuencia de la región estructural consenso humana.

25 La "afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y se puede representar, en general, por la constante de disociación (Kd). Se puede medir la afinidad por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. En lo que sigue se describen aspectos ilustrativos y ejemplares específicos para medir la afinidad de unión.

35 Un "anticuerpo agonista", como se usa en el presente documento, es un anticuerpo que activa una actividad biológica del antígeno al que se une.

40 Un "agente antiangiogénico" se refiere a un compuesto que bloquea, o interfiere en algún grado en, el desarrollo de los vasos sanguíneos. Un agente antiangiogénico puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña o anticuerpo que se une a un factor de crecimiento o receptor del factor de crecimiento implicado en promover la angiogénesis. En un aspecto, un agente antiangiogénico es un anticuerpo que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), tal como bevacizumab (AVASTIN).

45 La "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la inmunoglobulina segregada unida a receptores Fc (FcR) presente en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos NK, neutrófilos y macrófagos) posibilita que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora de antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, solo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 o 5.821.337 o la patente de EE. UU. n.º 6.737.056 (Presta). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen PBMC y linfocitos NK. De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar la actividad ADCC de la molécula de interés *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al. PNAS (USA)* 95:652-656 (1998). Se proporciona un ensayo ejemplar para evaluar la actividad ADCC en los ejemplos en el presente documento.

55 Las expresiones "anticuerpo anti-OX40" y "un anticuerpo que se une a OX40" se refieren a un anticuerpo que se puede unir a OX40 con una afinidad suficiente, de modo que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico al dirigirse a OX40. En un aspecto, el grado de unión de un anticuerpo anti-OX40 a una proteína distinta de OX40 no relacionada es de menos de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a OX40 como se mide, por ejemplo, por un radioinmunoanálisis (RIA). En determinados aspectos, un anticuerpo que se une a OX40 tiene una constante de disociación (Kd) de  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{ nM}$ ,  $\leq 10 \text{ nM}$ ,  $\leq 1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,01 \text{ nM}$  o  $\leq 0,001 \text{ nM}$  (por ejemplo,  $10^{-8} \text{ M}$  o menos, por ejemplo, de  $10^{-8} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ , por ejemplo, de  $10^{-9} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ ). En determinados aspectos, un anticuerpo anti-OX40 se une a un epítipo de OX40 que se conserva entre OX40 de diferentes especies.

65 Como se usa en el presente documento, la expresión "se une", "se une específicamente a" o "es específico para" se refiere a interacciones medibles y reproducibles, tal como la unión entre una diana y un anticuerpo, lo que es

determinante de la presencia de la diana en presencia de una población heterogénea de moléculas, incluyendo moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une a o se une específicamente a una diana (que puede ser un epítipo) es un anticuerpo que se une a esta diana con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que con la que se une a otras dianas. En un aspecto, el grado de unión de un anticuerpo a una diana no relacionada es de menos de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a la diana como se mide, por ejemplo, por un radioinmunoanálisis (RIA). En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une específicamente a una diana tiene una constante de disociación (Kd) de  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{ nM}$ ,  $\leq 10 \text{ nM}$ ,  $\leq 1 \text{ nM}$  o  $\leq 0,1 \text{ nM}$ . En determinados aspectos, un anticuerpo se une específicamente a un epítipo en una proteína que se conserva entre la proteína de diferentes especies. En otro aspecto, la unión específica puede incluir, pero no requiere, una unión exclusiva.

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50 % o más y, a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50 % o más. En el presente documento se proporciona un ensayo de competencia ejemplar.

El término "dominio de unión" se refiere a la región de un polipéptido que se une a otra molécula. En el caso de un FcR, el dominio de unión puede comprender una porción de una cadena de polipéptido del mismo (por ejemplo, la cadena alfa del mismo) que es responsable de la unión a una región Fc. Un dominio de unión útil es el dominio extracelular de una cadena alfa de FcR.

Un polipéptido con una Fc de IgG variante con actividad de FcR, ADCC o de fagocitosis "alterada" es uno que tiene actividad de unión a FcR (por ejemplo, FcγR) y/o actividad ADCC y/o actividad de fagocitosis potenciada o bien reducida en comparación con un polipéptido original o con un polipéptido que comprende una región Fc de secuencia natural.

El término "OX40", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier OX40 natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba el OX40 no procesado "de longitud completa", así como cualquier forma de OX40 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de OX40, por ejemplo, variantes de ajuste o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de un OX40 humano ejemplar se muestra en la SEQ ID NO: 1.

La "activación de OX40" se refiere a la activación del receptor OX40. En general, la activación de OX40 da como resultado la transducción de señales.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en los mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias malignas linfáticas. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen, pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), carcinoma de pulmón, incluyendo carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal y cáncer del estroma gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de las vías urinarias, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, melanoma, melanoma de extensión superficial, melanoma sobre lentigo maligno, melanomas lentiginosos acros, melanomas nodulares, mieloma múltiple y linfoma de linfocitos B; leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfoblástica aguda (LLA); tricoleucemia; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante (PTLD), así como proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), síndrome de Meigs, cáncer de cerebro, así como de cabeza y cuello y metástasis asociadas. En determinados aspectos, los cánceres susceptibles de tratamiento por los anticuerpos de la invención incluyen cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer rectal, carcinoma de pulmón no microcítico, glioblastoma, linfoma no hodgkiniano (LNH), cáncer de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer pancreático, sarcoma de partes blandas, sarcoma de Kaposi, carcinoma

carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, mesotelioma y mieloma múltiple. En algunos aspectos, el cáncer se selecciona de: carcinoma de pulmón no microcítico, glioblastoma, neuroblastoma, melanoma, carcinoma de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CCR) y carcinoma hepatocelular. Sin embargo, en algunos aspectos, el cáncer se selecciona de: carcinoma de pulmón no microcítico, cáncer colorrectal, glioblastoma y carcinoma de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), incluyendo las formas metastásicas de estos cánceres.

Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que se asocian con algún grado de proliferación celular anómala. En un aspecto, el trastorno proliferativo celular es cáncer.

El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , respectivamente.

La "citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). Se describen variantes de polipéptido con secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas (polipéptidos con una región Fc variante) y capacidad de unión a C1q incrementada o disminuida, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551 B1 y el documento WO 1999/51642. Véase también, por ejemplo, Idusogie *et al. J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

El término "agente citostático" se refiere a un compuesto o composición que detiene el crecimiento de una célula *in vitro* o bien *in vivo*. Por tanto, un agente citostático puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células en fase S. Otros ejemplos de agentes citostáticos incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular induciendo la detención de G0/G1 o la detención de la fase M. El anticuerpo anti-Her2 humanizado trastuzumab (HERCEPTIN®) es un ejemplo de un agente citostático que induce la detención de G0/G1. Los bloqueantes de la fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Determinados agentes que detienen G1 también abarcan la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbacina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Se puede encontrar información adicional en Mendelsohn e Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (W.B. Saunders, Filadelfia, 1995), por ejemplo, p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos derivados del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos previniendo la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de la mitosis en las células.

El término "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o provoca la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, isótopos radioactivos (por ejemplo, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> e isótopos radioactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas, tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas, tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas; y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos divulgados a continuación.

Un "anticuerpo anti-OX40 de disminución" es un anticuerpo anti-OX40 que destruye o disminuye las células que expresan OX40. Se puede lograr la disminución de las células que expresan OX40 por diversos mecanismos, tales como citotoxicidad y/o fagocitosis celular dependiente de anticuerpos. Se puede someter a ensayo *in vitro* la disminución de las células que expresan OX40, y se proporcionan en el presente documento procedimientos ejemplares para ensayos de ADCC y fagocitosis *in vitro*. En algunos modos de realización, la célula que expresa OX40 es un linfocito T efector CD4+ humano. En algunos modos de realización, la célula que expresa OX40 es una célula BT474 transgénica que expresa OX40 humano.

Las "funciones efectoras" se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC);

fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, el receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

5 Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

10 El "receptor Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunos modos de realización, un FcR es un FcR humano natural. En algunos aspectos, un FcR es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y, de forma alternativa, formas de ajuste de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase, por ejemplo, M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan, por ejemplo, en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se vayan a identificar en el futuro, se engloban por el término "FcR" en el presente documento. El término "receptor Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) y de la regulación de homeostasis de las inmunoglobulinas. Son conocidos procedimientos de medición de la unión a FcRn (véanse, por ejemplo, Ghetie y Ward., *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997); Ghetie *et al.*, *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997); Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004); documento WO 2004/92219 (Hinton *et al.*). Se pueden someter a ensayo la unión a FcRn humano *in vivo* y la semivida en suero de polipéptidos de unión de alta afinidad a FcRn humano, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas de células humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se administran los polipéptidos con una región Fc variante. El documento WO 2000/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con unión mejorada o reducida a los FcR. Véase también, por ejemplo, Shields *et al.* *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

30 El término "región Fc" se usa en el presente documento para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En un aspecto, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede estar o no estar presente. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácido en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

40 Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia natural. Las "funciones efectoras" ejemplares incluyen unión a C1q; CDC; unión al receptor Fc; ADCC; fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B, BCR), etc. Dichas funciones efectoras requieren, en general, que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se pueden evaluar usando diversos ensayos como se divulga, por ejemplo, en las definiciones en el presente documento.

45 Las "células efectoras humanas" se refieren a leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En determinados modos de realización, las células expresan al menos FcγRIII y realizan función/funciones efectora(s) ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC), linfocitos citotóxicos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente natural, por ejemplo, de sangre.

50 La "región estructural" o "FR" se refiere a los residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste, en general, en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen, en general, en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

55 Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

60 Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas" que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, pero puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o



seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Una "región estructural consenso humana" es una región estructural que representa los residuos de aminoácido que se producen lo más comúnmente en una selección de secuencias de la región estructural de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, publicación del NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. En un aspecto, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, *supra*. En un aspecto, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al.*, *supra*.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácido de HVR no humanas y residuos de aminoácido de FR humanas. En determinados aspectos, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, las CDR) se corresponden con las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR se corresponden con las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

El término "región hipervariable" o "HVR" como se usa en el presente documento se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia ("regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR") y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables") y/o contienen los residuos en contacto con el antígeno ("contactos con el antígeno"). En general, los anticuerpos comprenden seis HVR: tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR ejemplares en el presente documento incluyen:

(a) bucles hipervariables que se producen en los residuos de aminoácido 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(b) CDR que se producen en los residuos de aminoácido 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.<sup>a</sup> ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) contactos con el antígeno que se producen en los residuos de aminoácido 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum *et al. J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)); y

(d) combinaciones de (a), (b) y/o (c), incluyendo los residuos de aminoácido de HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, los residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*.

En un aspecto, los residuos de HVR comprenden los identificados en las **FIGS. 11A-I** o en otra parte en la memoria descriptiva.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado a una o más moléculas heterólogas incluyendo, pero sin limitarse a, un agente citotóxico.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinados aspectos, el individuo o sujeto es un ser humano.

"Promover el crecimiento o proliferación celular" significa incrementar el crecimiento o proliferación de una célula en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 %.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunos aspectos, se purifica un anticuerpo a más de un 95 % o un 99 % de pureza, como se determina, por ejemplo, por electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para obtener una revisión de los procedimientos para evaluar la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman *et al.*, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que sea diferente de su localización cromosómica natural.

Un "ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-OX40" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpo (o fragmentos de las mismas), incluyéndose dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico en un único vector o vectores separados, y estando dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico presente(s) en una o más localizaciones en una célula huésped.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes, en general, dichas variantes en cantidades despreciables. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítipos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige frente a un único determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se ha de interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por una variedad de técnicas, incluyendo, pero sin limitarse al procedimiento de hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana, describiéndose en el presente documento dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales.

Un "anticuerpo no marcado" se refiere a un anticuerpo que no se conjuga a un resto heterólogo (por ejemplo, un resto citotóxico) o radiomarcador. El anticuerpo no marcado puede estar presente en una formulación farmacéutica.

Los "anticuerpos naturales" se refieren a moléculas de inmunoglobulina natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales son glucoproteínas heterotetrámeras de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que se unen por disulfuros. Desde el extremo N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De forma similar, desde el extremo N al C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio ligero variable o dominio variable de la cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante. Una "región Fc de secuencia natural" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia natural incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia natural (alotipos A y distinto de A); región Fc de IgG2 humana de secuencia natural; región Fc de IgG3 humana de secuencia natural; y región Fc de IgG4 humana de secuencia natural, así como variantes naturales de las mismas.

El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias en relación con el uso de dichos productos terapéuticos.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido en la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en consideración ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación para los propósitos de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas formas que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr una alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los propósitos en el presente documento, se generan los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde se ha registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Se configuran todos los parámetros de comparación de secuencias por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que, de forma alternativa, se puede parafrasear como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de residuos de aminoácido puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácido en B. Se apreciará que si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa de ordenador ALIGN-2.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administraría la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no sea tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y las variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo que se está tratando, y que se puede realizar para la profilaxis o bien durante el curso de los análisis clínicos. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, la prevención de la aparición o recaída de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la reducción de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de las metástasis, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o atenuación de la enfermedad y la remisión o el pronóstico mejorado. En algunos aspectos, se usan los anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

El término "tumor" se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son mutuamente excluyentes como se hace referencia en el presente documento.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen, en general, estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt *et al. Kuby Immunology*, 6.ª ed., W.H. Freeman y Co., página 91 (2007)). Un dominio VH o VL único puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véanse, por ejemplo, Portolano *et al.*, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991).

Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia natural en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia natural o con la región Fc de un polipéptido original, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos y, preferentemente, de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia natural o en la región Fc del polipéptido original. La región Fc variante en el presente documento poseerá preferentemente al menos aproximadamente un 80 % de homología con una región Fc de secuencia natural y/o con una región Fc de un polipéptido original y, lo más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % de homología con la misma, más preferentemente al menos aproximadamente un 95 % de homología con la misma.

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que se enlaza. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se enlazan funcionalmente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

Una "región estructural consenso del subgrupo III de VH" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III pesado variable de Kabat *et al.* En un modo de realización, la secuencia de aminoácidos de la región estructural consenso del subgrupo III de VH comprende al menos una porción o todas de cada una de las siguientes secuencias: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 185)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 186)-H2-RFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC (SEQ ID NO: 187)-H3-WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO: 188).

Una "región estructural consenso del subgrupo I de VL" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa ligero variable de Kabat *et al.* En un modo de realización, la secuencia de aminoácidos de la región estructural consenso del subgrupo I de VH comprende al menos una porción o todas de cada una de las siguientes secuencias:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC (SEQ ID NO: 189)-L1- WYQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 190)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSIQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 191)-L3-FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 192).

El término "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o provoca la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, isótopos radioactivos (por ejemplo, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, B<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> e isótopos radioactivos de Lu); agentes quimioterápicos; agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas, tales como enzimas nucleolíticas; y toxinas, tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas. Se pueden seleccionar agentes citotóxicos ejemplares de agentes antimicrotúbulos, complejos de coordinación de platino, agentes alquilantes, agentes antibióticos, inhibidores de topoisomerasa II, antimetabolitos, inhibidores de topoisomerasa I, hormonas y análogos hormonales, inhibidores de la vía de transducción de señales, inhibidores de la angiogénesis por tirosina cinasas no receptoras, agentes inmunoterápicos, agentes proapoptóticos, inhibidores de LDH-A; inhibidores de la biosíntesis de ácidos grasos; inhibidores de señalización del ciclo celular; inhibidores de HDAC, inhibidores del complejo endopeptidásico multicatalítico; e inhibidores del metabolismo del cáncer.

En un aspecto, el agente citotóxico se selecciona de agentes antimicrotúbulos, complejos de coordinación de platino, agentes alquilantes, agentes antibióticos, inhibidores de topoisomerasa II, antimetabolitos, inhibidores de topoisomerasa I, hormonas y análogos hormonales, inhibidores de la vía de transducción de señales, inhibidores de la angiogénesis por tirosina cinasas no receptoras, agentes inmunoterápicos, agentes proapoptóticos, inhibidores de LDH-A, inhibidores de la biosíntesis de ácidos grasos, inhibidores de señalización del ciclo celular, inhibidores de HDAC, inhibidores del complejo endopeptidásico multicatalítico e inhibidores del metabolismo del cáncer. En un aspecto, el agente citotóxico es un taxano. En un aspecto, el taxano es paclitaxel o docetaxel. En un aspecto, el agente citotóxico es un agente de platino. En un aspecto, el agente citotóxico es un antagonista de EGFR. En un aspecto, el antagonista de EGFR es N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolin-4-amina (por ejemplo, erlotinib). En un aspecto, el agente citotóxico es un inhibidor de RAF. En un aspecto, el inhibidor de RAF es un inhibidor de BRAF y/o CRAF. En un aspecto, el inhibidor de RAF es vemurafenib. En un aspecto, el agente citotóxico es un inhibidor de PI3K.

El "agente quimioterápico" incluye compuestos químicos útiles en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), disulfiram, galato de epigalocatequina, salinosporamida A, carfilzomib, 17-AAG (geldanamicina), radicicol, lactato deshidrogenasa A (LDH-A), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), sunitib (SUTENT®, Pfizer/Sugen), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), finasunato (VATALANIB®, Novartis), oxaliplatino (ELOXATIN®, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), ácido folínico, rapamicina (sirólimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafamib (SCH 66336), sorafenib (NEXAVAR®, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), AG1478, agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclosfosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo, tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo topotecán e irinotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); adrenocorticosteroides (incluyendo prednisona y prednisolona); acetato de ciproterona; 5α-reductasas, incluyendo finasterida y dutasterida; vorinostat, romidepsina, panobinostat, ácido valproico, mocetinostat dolastatina; aldesleucina, duocarmicina talco (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uramustina; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos enodinos (por ejemplo, caliquemicina, especialmente caliquemicina γ11 y caliquemicina ω11 (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. 1994 33:183-186); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos enodinos de cromoproteínas relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN®

(doxorubicina), morfolinodoxorubicina, cianomorfolinodoxorubicina, 2-pirrolinodoxorubicina y desoxidoxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedor de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elfomitina; acetato de eliptinio; una eptilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; phenamet, pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbina; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizofina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquna; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano, vindesina; dacarbacina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL (paclitaxel; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE® (sin Cremophor), formulaciones de nanopartículas genomanipuladas con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.) y TAXOTERE® (docetaxel, doxetaxel; Sanofi-Aventis); clorambucilo; GEMZAR® (gemcitabina); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® (vinorelbina); novantrona; tenipósido; edatraxato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®); ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

El agente quimioterápico también incluye (i) agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de las hormonas sobre tumores, tales como antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor estrogénico (MSRE), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, yodoxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON® (citrato de toremifina); (ii) inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestano, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis) y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprorrelina y goserelina; buserelina, tripterelina, acetato de medroxiprogesterona, dietilestilbestrol, premarina, flouximesterona, todo el ácido transretinoico, fenretinida, así como troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); (iv) inhibidores de proteína cinasa; (v) inhibidores de lípido cinasa; (vi) oligonucleótidos antisentido, en particular, aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en la proliferación de células anómalas, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Ralf y H-Ras; (vii) ribocimas, tales como inhibidores de la expresión de VEGF (por ejemplo, ANGIOZYME®) e inhibidores de la expresión de HER2; (viii) vacunas, tales como vacunas para el tratamiento génico, por ejemplo, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® y VAXID®; PROLEUKIN®, rIL-2; un inhibidor de topoisomerasa 1, tal como LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; y (ix) sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

El agente quimioterápico también incluye anticuerpos tales como alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); cetuximab (ERBITUX®, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (OMNITARG®, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixia) y el conjugado anticuerpo-fármaco gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®, Wyeth). Los anticuerpos monoclonales humanizados adicionales con potencial terapéutico como agentes en combinación con los compuestos de la invención incluyen: apolizumab, aselizumab, atlizumab, bapineuzumab, bivatuzumab mertansina, cantuzumab mertansina, cedelizumab, certolizumab pegol, cidfusituzumab, cidtuzumab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, epratuzumab, erlizumab, felvizumab, fontolizumab, gemtuzumab ozogamicina, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, labetuzumab, lintuzumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, motovizumab, natalizumab, nimotuzumab, nolovizumab, numavizumab, orelizumab, omalizumab, palivizumab, pascolizumab, pectuzumab, pexelizumab, ralvizumab, ranibizumab, reslivizumab, reslizumab, resyvizumab, rovelizumab, ruplizumab, sibrotuzumab, siplizumab, sontuzumab, tacatuzumab tetraxetano, tadocizumab, talizumab, tefibazumab, tocilizumab, toralizumab, tucotuzumab celmoleucina, tucosituzumab, umavizumab, urtoxazumab, ustekinumab, visilizumab, y el anti interleucina 12 (ABT-874/J695, Wyeth Research and Abbott Laboratories), que es un anticuerpo IgG1 λ de longitud completa exclusivamente de secuencia humana recombinante genéticamente modificado para reconocer la proteína con p40 interleucina 12.

El agente quimioterápico también incluye "inhibidores de EGFR", que se refieren a compuestos que se unen a o de otro modo interactúan directamente con EGFR y previenen o reducen su actividad de señalización, y se denominan de forma alternativa "antagonistas de EGFR". Los ejemplos de dichos agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Los ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase la patente

- de EE. UU. n.º 4.943.533, Mendelsohn *et al.*) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano (H225) remodelado (véase, el documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo dirigido a EGFR completamente humano (Imclone); anticuerpos que se unen a EGFR mutante de tipo II (patente de EE. UU. n.º 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tales como ABX-EGF o Panitumumab (véase el documento WO98/50433, Abgenix/Amgen); EMD 55900 (Stragliotto *et al.* Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab), un anticuerpo frente a EGFR humanizado dirigido frente a EGFR que compete tanto con EGF como con TGF-alfa por la unión a EGFR (EMD/Merck); anticuerpo frente a EGFR humano, HuMax-EGFR (GenMab); anticuerpos completamente humanos conocidos como E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3. y E7.6.3 y descritos en el documento US 6.235.883; MDX-447 (Medarex Inc); y mAb 806 o mAb 806 humanizado (Johns *et al.*, J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR se puede conjugar con un agente citotóxico, generando, por tanto, un inmunoconjugado (véase, por ejemplo, el documento EP659,439A2, Merck Patent GmbH). Los antagonistas de EGFR incluyen moléculas pequeñas, tales como los compuestos descritos en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.616.582, 5.457.105, 5.475.001, 5.654.307, 5.679.683, 6.084.095, 6.265.410, 6.455.534, 6.521.620, 6.596.726, 6.713.484, 5.770.599, 6.140.332, 5.866.572, 6.399.602, 6.344.459, 6.602.863, 6.391.874, 6.344.455, 5.760.041, 6.002.008 y 5.747.498, así como las siguientes publicaciones PCT: los documentos WO98/14451, WO98/50038, WO99/09016 y WO99/24037. Los antagonistas de EGFR de moléculas pequeñas particulares incluyen OSI-774 (CP-358774, erlotinib, TARCEVA® Genentech/OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, diclorhidrato de N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinil]-2-propenamida, Pfizer Inc.); ZD1839, gefitinib (IRESSA®) 4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolina, AstraZeneca); ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metilfenil-amino)-quinazolina, Zeneca); BIBX-1382 (N8-(3-cloro-4-fluoro-fenil)-N2-(1-metil-piperidin-4-il)-pirimido[5,4-d]pirimidin-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-feniletíl)amino]-1H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol); (R)-6-(4-hidroxifenil)-4-[(1-feniletíl)amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina); CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butenamida); EKB-569 (N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida) (Wyeth); AG1478 (Pfizer); AG1571 (SU 5271; Pfizer); inhibidores de tirosina cinasa dobles para EGFR/HER2, tales como lapatinib (TYKERB®, GSK572016 o N-[3-cloro-4-[(3 fluorofenil)metoxi]fenil]-6[[[2metilsulfonil]etil]amino]metil]-2-furanil]-4-quinazolinamina).
- Los agentes quimioterápicos también incluyen "inhibidores de tirosina cinasa", incluyendo los fármacos dirigidos a EGFR indicados en el párrafo precedente; inhibidor de tirosina cinasa para HER2 de moléculas pequeñas, tal como TAK165, disponible de Takeda; CP-724,714, un inhibidor selectivo oral del receptor tirosina cinasa ErbB2 (Pfizer y OSI); inhibidores de HER dobles, tales como EKB-569 (disponible de Wyeth), que se une preferentemente a EGFR, pero inhibe tanto las células que sobreexpresan HER2 como EGFR; lapatinib (GSK572016; disponible de Glaxo-SmithKline), un inhibidor de tirosina cinasa oral para HER2 y EGFR; PKI-166 (disponible de Novartis); inhibidores de pan-HER, tales como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores de Raf-1, tales como el agente antisentido ISIS-5132, disponible de ISIS Pharmaceuticals, que inhiben la señalización de Raf-1; inhibidores de TK no dirigidos a HER, tales como mesilato de imatinib (GLEEVEC®, disponible de Glaxo SmithKline); inhibidores de tirosina cinasa con múltiples dianas, tales como sunitinib (SUTENT®, disponible de Pfizer); inhibidores de tirosina cinasa para los receptores de VEGF, tales como vatalanib (PTK787/ZK222584, disponible de Novartis/Schering AG); inhibidor de cinasas reguladas extracelularmente I de MAPK CI-1040 (disponible de Pharmacia); quinazolininas, tales como PD 153035, 4-(3-cloroanilino)quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidinas; curcumina (diferuloilmetano, 4,5-bis(4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contienen restos nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas antisentido (por ejemplo, las que se unen a ácido nucleico que codifica HER); quinoxalinas (patente de EE. UU. n.º 5.804.396); trifostinas (patente de EE. UU. n.º 5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores de pan-HER, tales como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de imatinib (GLEEVEC®); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); semaxinib (Pfizer); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone), rapamicina (sirólimus, RAPAMUNE®); o como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: patente de EE. UU. n.º 5.804.396; documentos WO 1999/09016 (American Cyanamid); WO 1998/43960 (American Cyanamid); WO 1997/38983 (Warner Lambert); WO 1999/06378 (Warner Lambert); WO 1999/06396 (Warner Lambert); WO 1996/30347 (Pfizer, Inc); WO 1996/33978 (Zeneca); WO 1996/3397 (Zeneca) y WO 1996/33980 (Zeneca).
- Los agentes quimioterápicos también incluyen dexametasona, interferones, colquicina, metoprina, ciclosporina, anfotericina, metronidazol, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, amifostina, trióxido de arsénico, asparaginasa, BCG viva, bevacuzimab, bexaroteno, cladribina, clofarabina, darberpoetina alfa, denileucina, dexrazoxano, epoetina alfa, elotinib, filgrastim, acetato de histrelin, ibritumomab, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, lenalidomida, levamisol, mesna, metoxaleno, nandrolona, nelarabina, nofetumomab, oprelvecina, palifermina, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, pemetrexed disódico, plicamicina, porfímero sódico, mepacrina, rasburicasa, sargramostim, temozolomida, VM-26, 6-TG, toremifeno, tretinoína, ATRA, valrubicina, zoledronato y ácido zoledrónico y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- Los agentes quimioterápicos también incluyen hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, acetato de cortisona, pivalato de tixocortol, acetónido de triamcinolona, alcohol de triamcinolona, mometasona, amcinónida, budesónida, desónida, fluocinónida, acetónido de fluocinolona, betametasona, fosfato sódico de betametasona, dexametasona, fosfato sódico

de dexametasona, flucortolona, 17-butilato de hidrocortisona, 17-valerato de hidrocortisona, dipropionato de aclometasona, valerato de betametasona, dipropionato de betametasona, prednicartrato, 17-butilato de clobetasona, 17-propionato de clobetasol, caproato de flucortolona, pivalato de flucortolona y acetato de fluprednido; péptidos antiinflamatorios selectivos inmunitarios (AISI), tales como fenilalanina-glutamina-glicina (FEG) y su forma D-isómera (feG) (IMULAN BioTherapeutics, LLC); fármacos antirreumáticos, tales como azatioprina, ciclosporina (ciclosporina A), D-penicilamina, sales de oro, hidroxicloloroquina, leflunomideminociclina, sulfasalazina, bloqueantes del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), tales como etanercept (Enbrel), infliximab (Remicade), adalimumab (Humira), certolizumab pegol (Cimzia), golimumab (Simponi), bloqueantes de interleucina 1 (IL-1), tales como anakinra (Kineret), bloqueantes de la coestimulación de linfocitos T, tales como abatacept (Orencia), bloqueantes de interleucina 6 (IL-6), tales como tocilizumab (ACTEMERA®); bloqueantes de interleucina 13 (IL-13), tales como lebrizumab; bloqueantes de interferón (IFN) alfa, tales como Rontalizumab; bloqueantes de integrinas beta-7, tales como rhuMab Beta7; bloqueantes de la vía de IgE, tales como anti-M1 prima; bloqueantes de LTA3 homotrimerica y heterotrimerico LTA1/ $\beta$ 2 unido a membrana segregados, tales como anti linfotóxina alfa (LTA); isótopos radioactivos (por ejemplo, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> e isótopos radioactivos de Lu); diversos agentes en investigación, tales como tioplatino, PS-341, fenilbutirato, ET-18-OCH<sub>3</sub>, o inhibidores de farnesiltransferasa (L-739749, L-744832); polifenoles, tales como quercetina, resveratrol, piceatannol, galato de epigallocatequina, teaflavinas, flavanoles, procianidinas, ácido betulínico y derivados de los mismos; inhibidores de la autofagia, tales como cloroquina; delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colquicinas, ácido betulínico; acetilcamptotecina, escoplectina y 9-aminocamptotecina); podofilotoxina; tegafur (UFTORAL®); bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos, tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); vacunas, tales como la vacuna THERATOPE®; perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteosoma (por ejemplo, PS341); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2, tal como oblimersen sódico (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores de farnesiltransferasa, tales como lonafarnib (SCH 6636, SARASARTM); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como CHOP, una abreviatura para un tratamiento combinado de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura para una pauta de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINTM) combinado con 5-FU y ácido fólico.

Los agentes quimioterápicos también incluyen antiinflamatorios no esteroideos con efectos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios. Los AINE incluyen inhibidores no selectivos de la enzima ciclooxigenasa. Los ejemplos específicos de AINE incluyen aspirina, derivados de ácido propiónico, tales como ibuprofeno, fenoprofeno, cetoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina y naproxeno, derivados de ácido acético, tales como indometacina, sulindac, etodolaco, diclofenaco, derivados de ácido enólico, tales como piroxicam, meloxicam, tenoxicam, droxicam, lornoxicam e isoxicam, derivados de ácido fenámico, tales como ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, ácido tolfenámico e inhibidores de COX-2, tales como celecoxib, etoricoxib, lumiracoxib, parecoxib, rofecoxib, rofecoxib y valdecoxib. Los AINE pueden estar indicados para el alivio sintomático de afecciones tales como artritis reumatoide, artrosis, artropatías inflamatorias, espondiloartritis anquilosante, artritis psoriásica, síndrome de Reiter, gota aguda, dismenorrea, dolor óseo metastásico, cefalea y migraña, dolor posoperatorio, dolor de leve a moderado debido a inflamación y lesión tisular, fiebre, íleo y cólico renal.

El término "citocina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de dichas citocinas son linfocinas, monocinas; interleucinas (IL), tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ ; y otros factores polipeptídicos, incluyendo LIF y ligando kit (LK) e interferón gamma. Como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia natural, incluyendo entidades de moléculas pequeñas producidas sintéticamente y derivados y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

El término "antagonista de unión al eje de PD-1" es una molécula que inhibe la interacción de un compañero de unión al eje de PD-1 con uno o bien más de sus compañeros de unión, para eliminar la disfunción de los linfocitos T que resulta de la señalización en el eje de señalización de PD-1, siendo un resultado el restablecimiento o potenciación de la función de los linfocitos T (por ejemplo, la proliferación, producción de citocinas, destrucción de células diana). Como se usa en el presente documento, un antagonista de unión al eje de PD-1 incluye un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de unión a PD-L2.

El término "antagonistas de unión a PD-1" es una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-L1, PD-L2. En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1 y/o PD-L2. Por ejemplo, los antagonistas de unión a PD-1 incluyen anticuerpos anti-PD-1, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoconjugados, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-1 con PD-L1 y/o PD-L2. En un aspecto, un antagonista de unión a PD-1 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-1 para

hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, potenciando las respuestas efectoras con respecto al reconocimiento antigénico). En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1. En un aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MDX-1 106 descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es Merck 3745 descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es CT-011 descrito en el presente documento.

El término "antagonistas de unión a PD-L1" es una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o bien más de sus compañeros de unión, tales como PD-1, B7-1. En algunos aspectos, un antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 y/o B7-1. En algunos aspectos, los antagonistas de unión a PD-L1 incluyen anticuerpos anti-PD-L1, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1, B7-1. En un aspecto, un antagonista de unión a PD-L1 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L1 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, potenciando las respuestas efectoras con respecto al reconocimiento antigénico). En algunos modos de realización, un antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En un aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es YW243.55.S70 descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1 105 descrito en el presente documento. Todavía en otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MPDL3280A descrito en el presente documento.

El término "antagonistas de unión a PD-L2" es una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L2 con uno o bien más de sus compañeros de unión, tales como PD-1. En algunos aspectos, un antagonista de unión a PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L2 inhibe la unión de PD-L2 a PD-1. En algunos aspectos, los antagonistas de PD-L2 incluyen anticuerpos anti-PD-L2, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L2 con uno o bien más de sus compañeros de unión, tales como PD-1. En un aspecto, un antagonista de unión a PD-L2 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L2 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, potenciando las respuestas efectoras con respecto al reconocimiento antigénico). En algunos modos de realización, un antagonista de unión a PD-L2 es una inmunoadhesina.

El término "fagocitosis" significa la internalización de células o partículas por las células. En algunos modos de realización, las células fagocíticas o fagocitos son macrófagos o neutrófilos. En algunos aspectos, las células son células que expresan OX40 humano. Son conocidos en la técnica procedimientos para someter a ensayo la fagocitosis e incluyen el uso de microscopía para detectar la presencia de células internalizadas dentro de otras células. En otros aspectos, se detecta la fagocitosis usando FACS, por ejemplo, detectando la presencia de una célula marcada de forma detectable dentro de otra célula (que puede estar marcada de forma detectable, por ejemplo, con un marcador diferente de la primera célula).

La frase "no posee actividad sustancial" o "sustancialmente ninguna actividad" con respecto a un anticuerpo, como se usa en el presente documento, significa que el anticuerpo no presenta ninguna actividad que esté por encima del nivel base (en algunos modos de realización, que esté por encima del nivel base que es estadísticamente significativo). La frase "poca o ninguna actividad" con respecto a un anticuerpo, como se usa en el presente documento, significa que el anticuerpo no presenta una cantidad biológicamente significativa de una función. Se puede medir o detectar la función de acuerdo con cualquier ensayo o técnica conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los descritos en el presente documento. En algunos aspectos, la función del anticuerpo es la estimulación de la proliferación de linfocitos T efectoras y/o segregación de citocinas.

El término "biomarcador" o "marcador" como se usa en el presente documento se refiere, en general, a una molécula, que incluye un gen, ARNm, proteína, estructura de carbohidrato o glucolípido, cuya expresión en o sobre un tejido o célula o segregado se puede detectar por procedimientos conocidos (o los procedimientos divulgados en el presente documento) y es predictiva o se puede usar para predecir (o ayudar en la predicción de) la sensibilidad de una célula, tejido o paciente a las pautas de tratamiento.

Por "muestra del paciente" se entiende la recogida de células o líquidos obtenidos de un paciente con cáncer. La fuente de la muestra de tejido o de células puede ser un tejido sólido como el de un aspirado o biopsia o muestra de tejido u órgano recién extraído, congelado y/o conservado; sangre o cualquier constituyente de la sangre; líquidos corporales, tales como líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido intersticial; células de cualquier momento en la gestación o desarrollo del sujeto. La muestra de tejido puede contener compuestos que no se mezclen de forma natural con el tejido en la naturaleza, tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares. Los ejemplos de muestras de tumor en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, biopsia tumoral, aspirado con aguja fina, lavado bronquiolar, líquido pleural, esputo, orina, una



muestra quirúrgica, células tumorales circulantes, suero, plasma, proteínas plasmáticas circulantes, líquido ascítico, cultivos celulares primarios o líneas celulares derivadas de tumores o que presentan propiedades similares a tumor, así como muestras de tumor conservadas, tales como muestras de tumor fijadas con formol, incluidas en parafina o muestras de tumor congeladas.

5 La frase "en base a la expresión de" cuando se usa en el presente documento significa que la información sobre el nivel de expresión o presencia o ausencia de expresión (por ejemplo, la presencia o ausencia o prevalencia de (por ejemplo, el porcentaje de células que presentan) del uno o más biomarcadores en el presente documento (por ejemplo, la presencia o ausencia de o cantidad o prevalencia de células que expresan FcR, o, por ejemplo, la presencia o ausencia o cantidad o prevalencia de células efectoras humanas) se usa para informar sobre una decisión de tratamiento, información proporcionada en un prospecto del envase u orientación sobre comercialización/promocional, etc.

15 Una muestra de cáncer o biológica que "tiene células efectoras humanas" es una que, en una prueba de diagnóstico, tiene células efectoras humanas presentes en la muestra (por ejemplo, células efectoras humanas infiltrantes).

20 Una muestra de cáncer o biológica que "tiene células que expresan FcR" es una que, en una prueba de diagnóstico, tiene expresión de FcR presente en la muestra (por ejemplo, células que expresan FcR infiltrantes). En algunos modos de realización, FcR es FcγR. En algunos modos de realización, FcR es un FcγR activador.

25 La frase "recomendación de un tratamiento" como se usa en el presente documento se refiere a usar la información o datos generados en relación con el nivel o presencia de c-met en una muestra de un paciente para identificar al paciente como tratado adecuadamente o no tratado adecuadamente con un tratamiento. En algunos aspectos, el tratamiento puede comprender anticuerpos frente a c-met (por ejemplo, onartuzumab). En algunos aspectos, el tratamiento puede comprender un antagonista de VEGF (por ejemplo, bevacizumab). En algunos aspectos, el tratamiento puede comprender un anticuerpo agonista anti-OX40 humano. La información o datos pueden estar en cualquier forma, escrita, oral o electrónica. En algunos aspectos, el uso de la información o datos generados incluye la comunicación, presentación, información, almacenamiento, envío, transferencia, suministro, transmisión, entrega, distribución o combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, la comunicación, presentación, información, almacenamiento, envío, transferencia, suministro, transmisión, distribución o combinaciones de los mismos se realizan por un dispositivo informático, unidad de analizador o combinación de los mismos. En algunos aspectos adicionales, la comunicación, presentación, información, almacenamiento, envío, transferencia, suministro, transmisión, distribución o combinaciones de los mismos se realizan por un individuo (por ejemplo, un profesional de laboratorio o médico). En algunos aspectos, la información o datos incluyen una comparación de la cantidad o prevalencia de células que expresan FcR con respecto a un nivel de referencia. En algunos aspectos, la información o datos incluyen una comparación de la cantidad o prevalencia de células efectoras humanas con respecto a un nivel de referencia. En algunos aspectos, la información o datos incluyen una indicación de que las células efectoras humanas o células que expresan FcR están presentes o ausentes en la muestra. En algunos aspectos, la información o datos incluyen una indicación de que las células que expresan FcR y/o células efectoras humanas están presentes en un porcentaje particular de células (por ejemplo, alta prevalencia). En algunos aspectos, la información o datos incluyen una indicación de que el paciente se trata adecuadamente o no se trata adecuadamente con un tratamiento que comprende un anticuerpo agonista anti-OX40 humano.

## 45 II. COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS

En un aspecto, la divulgación se basa, en parte, en la identificación de una variedad de agentes de unión a OX40. En determinados aspectos, se proporcionan anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos agonistas) que se unen a OX40 humano. Los anticuerpos de la divulgación son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento del cáncer y otros trastornos asociados con la expresión y/o actividad de OX40.

### 50 A. Anticuerpos anti-OX40 ejemplares

En un aspecto, lo proporcionado son anticuerpos aislados que se unen a OX40 humano.

55 En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano se une a OX40 humano con una afinidad de menos de o igual a aproximadamente 0,45 nM. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-OX40 humano se une a OX40 humano con una afinidad de menos de o igual a aproximadamente 0,4 nM. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-OX40 humano se une a OX40 humano con una afinidad de menos de o igual a aproximadamente 0,5 nM. En algunos aspectos, se determina la afinidad de unión usando radioinmunoanálisis.

60 En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano se une a OX40 humano y a OX40 de macaco cangrejero. En algunos aspectos, la unión se determina usando un ensayo por FACS. En algunos aspectos, la unión a OX40 humano tiene una CE<sub>50</sub> de aproximadamente 0,2 µg/ml. En algunos aspectos, la unión a OX40 humano tiene una CE<sub>50</sub> de aproximadamente 0,3 µg/ml o menor. En algunos aspectos, la unión a OX40 de macaco cangrejero tiene una CE<sub>50</sub> de aproximadamente 1,5 µg/ml. En algunos aspectos, la unión a OX40 de macaco cangrejero tiene una CE<sub>50</sub> de aproximadamente 1,4 µg/ml.

En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano no se une a OX40 de rata o a OX40 de ratón.

- 5 En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano es un anticuerpo anti-OX40 humano de disminución (por ejemplo, disminuye las células que expresan OX40 humano). En algunos aspectos, las células que expresan OX40 humano son linfocitos T efectores CD4+. En algunos aspectos, las células que expresan OX40 humano son linfocitos Treg. En algunos aspectos, la disminución es por ADCC y/o fagocitosis. En algunos aspectos, el anticuerpo media en la ADCC uniéndose a FcγR expresado por una célula efectora humana y activando la función de la célula efectora humana. En algunos aspectos, el anticuerpo media en la fagocitosis uniéndose a FcγR expresado por una célula efectora humana y activando la función de la célula efectora humana. Las células efectoras humanas ejemplares incluyen, por ejemplo, macrófagos, linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, neutrófilos. En algunos modos de realización, la célula efectora humana es un macrófago. En algunos aspectos, la célula efectora humana es linfocitos NK. En algunos aspectos, la disminución no es por apoptosis.
- 10
- 15 En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano tiene una región Fc funcional. En algunos aspectos, la función efectora de una región Fc funcional es la ADCC. En algunos aspectos, la función efectora de una región Fc funcional es la fagocitosis. En algunos aspectos, la función efectora de una región Fc funcional es la ADCC y fagocitosis. En algunos aspectos, la región Fc es la IgG1 humana. En algunos aspectos, la región Fc es la IgG4 humana.
- 20
- En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano no induce la apoptosis en células que expresan OX40 (por ejemplo, Treg). En algunos aspectos, se somete a ensayo la apoptosis usando una concentración de anticuerpo de 30 µg/ml, por ejemplo, determinando si se ha producido apoptosis usando Treg teñido con anexina V y yoduro de propodio.
- 25
- En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano potencia la función de los linfocitos T efectores CD4+, por ejemplo, incrementando la proliferación de linfocitos T efectores CD4+ y/o incrementando la producción de interferón gamma por los linfocitos T efectores CD4+ (por ejemplo, en comparación con la proliferación y/o producción de citocinas antes del tratamiento con el anticuerpo agonista anti-OX40 humano). En algunos aspectos, la citocina es interferón gamma. En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano incrementa el número de linfocitos T efectores CD4+ intratumorales (infiltrantes) (por ejemplo, el número total de linfocitos T efectores CD4+, o, por ejemplo, el porcentaje de células CD4+ en células CD45+), por ejemplo, en comparación con el número de linfocitos T CD4+ intratumorales (infiltrantes) antes del tratamiento con el anticuerpo agonista anti-OX40 humano. En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano incrementa el número de linfocitos T efectores CD4+ intratumorales (infiltrantes) que expresan el interferón gamma (por ejemplo, las células CD4+ que expresan el interferón gamma totales, o, por ejemplo, el porcentaje de células CD4+ que expresan el interferón gamma en las células CD4+ totales), por ejemplo, en comparación con el número de linfocitos T CD4+ intratumorales (infiltrantes) que expresan el interferón gamma antes del tratamiento con el anticuerpo agonista anti-OX40 humano.
- 30
- 35
- 40 En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano incrementa el número de linfocitos T efectores CD8+ intratumorales (infiltrantes) (por ejemplo, el número total de linfocitos T efectores CD8+, o, por ejemplo, el porcentaje de CD8+ en células CD45+), por ejemplo, en comparación con el número de linfocitos T efectores CD8+ intratumorales (infiltrantes) antes del tratamiento con el anticuerpo agonista anti-OX40 humano. En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano incrementa el número de linfocitos T efectores CD8+ intratumorales (infiltrantes) que expresan el interferón gamma (por ejemplo, el porcentaje de células CD8+ que expresan el interferón gamma en las células CD8+ totales), por ejemplo, en comparación con el número de linfocitos T CD8+ intratumorales (infiltrantes) que expresan el interferón gamma antes del tratamiento con el anticuerpo agonista anti-OX40 humano.
- 45
- 50 En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano potencia la función de los linfocitos T de memoria, por ejemplo, incrementando la proliferación de linfocitos T de memoria y/o incrementando la producción de citocinas por la célula de memoria. En algunos aspectos, la citocina es interferón gamma.
- En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano inhibe la función de los Treg, por ejemplo, disminuyendo la supresión por Treg de la función de los linfocitos T efectores (por ejemplo, la proliferación de linfocitos T efectores y/o segregación de citocinas por los linfocitos T efectores). En algunos aspectos, el linfocito T efector es un linfocito T efector CD4+. En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano reduce el número de Treg intratumorales (infiltrantes) (por ejemplo, el número total de Treg o, por ejemplo, el porcentaje de células Fox3p+ en las células CD4+).
- 55
- 60 En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano se genomanipula para incrementar la función efectora (por ejemplo, en comparación con la función efectora en una IgG1 natural). En algunos aspectos, el anticuerpo ha incrementado la unión a un receptor Fcγ. En algunos aspectos, el anticuerpo carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a la región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser de un 1 % a un 80 %, de un 1 % a un 65 %, de un 5 % a un 65 % o de un 20 % a un 40 %. En algunos aspectos, la región Fc comprende oligosacáridos bisecados, por ejemplo, en los que un oligosacárido biantenarino unido a la región Fc del anticuerpo se biseca por GlcNAc. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de
- 65

aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de los residuos).

5 En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano incrementa la transducción de señales por OX40 en una célula diana que expresa OX40. En algunos aspectos, se detecta la transducción de señales por OX40 supervisando la señalización en dirección 3' de NFkB.

10 En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano es estable después del tratamiento a 40 °C durante dos semanas.

15 En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano se une a las células efectoras humanas, por ejemplo, se une a FcγR (por ejemplo, un FcγR activador) expresado por células efectoras humanas. En algunos aspectos, la célula efectora humana realiza (puede realizar) la función efectora ADCC. En algunos aspectos, la célula efectora humana realiza (puede realizar) la función efectora fagocitosis.

20 En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende un polipéptido con Fc de IgG1 variante que comprende una mutación que elimina la unión a las células efectoras humanas (por ejemplo, una mutación DANA) tiene actividad reducida (por ejemplo, la función de los linfocitos T efectores CD4+, por ejemplo, la proliferación), con respecto al anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende la porción Fc de IgG1 de secuencia natural. En algún modo de realización, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende un polipéptido con Fc de IgG1 variante que comprende una mutación que elimina la unión a células efectoras humanas (por ejemplo, una mutación DANA) no posee actividad sustancial (por ejemplo, la función de los linfocitos T efectores CD4+, por ejemplo, la proliferación).

25 En algunos aspectos, se requiere la reticulación del anticuerpo para la función del anticuerpo agonista anti-OX40 humano. En algunos aspectos, la función es la estimulación de la proliferación de linfocitos T efectores CD4+. En algunos aspectos, se determina la reticulación del anticuerpo proporcionando el anticuerpo agonista anti-OX40 humano adherido sobre una superficie sólida (por ejemplo, una placa de cultivo celular). En algunos aspectos, se determina la reticulación del anticuerpo introduciendo una mutación en la porción Fc de IgG1 del anticuerpo (por ejemplo, una mutación DANA) y la función de prueba del anticuerpo mutante.

30 En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano compite por su unión a OX40 humano con OX40L. En algunos aspectos, la adición de OX40L no potencia la función del anticuerpo anti-OX40 humano en un ensayo *in vitro*.

35 De acuerdo con otro modo de realización, los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano incluyen una cualquiera, cualquier combinación o todas de las siguientes propiedades: (1) se une a OX40 humano con una afinidad de menos de o igual a aproximadamente 0,45 nM, en algunos aspectos, se une a OX40 humano con una afinidad de menos de o igual a aproximadamente 0,4 nM, en algunos aspectos, se une a OX40 humano con una afinidad de menos de o igual a aproximadamente 0,5 nM, en algunos aspectos, la afinidad de unión se determina usando radioinmunoanálisis; (2) se une a OX40 humano y a OX40 de macaco cangrejero, en algunos aspectos, la unión se determina usando un ensayo por FACS, (3) se une a OX40 humano con una CE<sub>50</sub> de aproximadamente 0,2 ug/ml, en algunos aspectos, se une a OX40 humano con una CE<sub>50</sub> de aproximadamente 0,3 ug/ml o menor, en algunos aspectos, se une a OX40 de macaco cangrejero con una CE<sub>50</sub> de aproximadamente 1,5 ug/ml, en algunos aspectos, se une a OX40 de macaco cangrejero con una CE<sub>50</sub> de aproximadamente 1,4 ug/ml, (4) no se une sustancialmente a OX40 de rata o a OX40 de ratón, (6) es un anticuerpo anti-OX40 humano de disminución (por ejemplo, disminuye las células que expresan OX40 humano), en algunos aspectos, las células son linfocitos T efectores CD4+ y/o linfocitos Treg, (7) potencia la función de los linfocitos T efectores CD4+, por ejemplo, incrementando la proliferación de linfocitos T efectores CD4+ y/o incrementando la producción de interferón gamma por los linfocitos T efectores CD4+ (por ejemplo, en comparación con la proliferación y/o producción de citocinas antes del tratamiento con el anticuerpo agonista anti-OX40 humano), (8) potencia la función de los linfocitos T de memoria, por ejemplo, incrementando la proliferación de linfocitos T de memoria y/o incrementando la producción de citocinas por la célula de memoria, (9) inhibe la función de los Treg, por ejemplo, disminuyendo la supresión por Treg de la función de los linfocitos T efectores (por ejemplo, la proliferación de linfocitos T efectores y/o segregación de citocinas por los linfocitos T efectores). En algunos aspectos, el linfocito T efector es un linfocito T efector CD4+, (10) incrementa la transducción de señales por OX40 en una célula diana que expresa OX40 (en algunos aspectos, se detecta la transducción de señales por OX40 supervisando la señalización en dirección 3' de NFkB), (11) es estable después del tratamiento a 40 °C durante dos semanas, (12) se une a células efectoras humanas, por ejemplo, se une a FcγR expresado por células efectoras humanas, (13) el anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende un polipéptido con Fc de IgG1 variante que comprende una mutación que elimina la unión a células efectoras humanas (por ejemplo, N297G) tiene actividad reducida (por ejemplo, la función de los linfocitos T efectores CD4+, por ejemplo, la proliferación), con respecto al anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende la porción Fc de IgG1 de secuencia natural, en algún modo de realización, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende un polipéptido con Fc de IgG1 variante que comprende una mutación que elimina la unión a células efectoras humanas (por ejemplo, N297G) no posee actividad sustancial (por ejemplo, la función de los linfocitos T efectores CD4+, por ejemplo, la proliferación), (14) se requiere la reticulación del anticuerpo (por ejemplo, por la unión al receptor Fc) para la función del anticuerpo agonista anti-OX40 humano.



de SEQ ID NO: 5; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (f) HVR-L3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 26.

En un aspecto, se divulga un anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27. En otro modo realización, el anticuerpo comprende HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27, y HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En otro aspecto, un anticuerpo divulgado en el presente documento comprende (a) un dominio VH, que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, (ii) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y (iii) HVR-H3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4; y (b) un dominio VL, que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, (ii) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.

En otro aspecto, se divulga un anticuerpo que comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (f) HVR-L3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 27.

En un aspecto, se divulga un anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 8 o 9; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 10, 11, 12, 13 o 14; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 15 o 19; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28.

En un aspecto, se divulga un anticuerpo que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 8 o 9; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 10, 11, 12, 13 o 14; y (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 15 o 19. En un aspecto, el anticuerpo comprende HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 15 o 19. En otro modo de realización, el anticuerpo comprende HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 15 o 19, y HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28. En otro aspecto, el anticuerpo comprende HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 15 o 19, HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28, y HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 10, 11, 12, 13 o 14. En otro aspecto, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 8 o 9; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 10, 11, 12, 13 o 14; y (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 15 o 19.

En otro aspecto, se divulga un anticuerpo que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (a) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (b) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28. En un modo de realización, el anticuerpo comprende (a) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (b) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28.

En otro aspecto, un anticuerpo comprende (a) un dominio VH, que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 8 o 9, (ii) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 10, 11, 12, 13 o 14, y (iii) HVR-H3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4, 15 o 19; y (b) un dominio VL, que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, (ii) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, 22, 23,

24, 25, 26, 27 o 28.

5 En otro aspecto, lo divulgado es un anticuerpo que comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 8 o 9; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 10, 11, 12, 13 o 14; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 15 o 19; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (f) HVR-L3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 7, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28.

10 En un aspecto, se divulga un anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 175. En algún aspecto, HVR-H2 no es **DMYPDAAAASYNQKTRE** (SEQ ID NO: 193). En algunos aspectos, HVR-H3 no es **APRWAAAA** (SEQ ID NO: 194). En algunos aspectos, HVR-L3 no es **QAAAAAAAT** (SEQ ID NO: 195).

20 En un aspecto, se divulga un anticuerpo que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173; y (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174. En un aspecto, el anticuerpo comprende HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174. En otro aspecto, el anticuerpo comprende HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174, y HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 175. En otro aspecto, el anticuerpo comprende HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174, HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 175, y HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173. En otro aspecto, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173; y (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174. En algún aspecto, HVR-H2 no es **DMYPDAAAASYNQKTRE** (SEQ ID NO: 193). En algunos aspectos, HVR-H3 no es **APRWAAAA** (SEQ ID NO: 194). En algunos aspectos, HVR-L3 no es **QAAAAAAAT** (SEQ ID NO: 195).

35 En otro aspecto, se divulga un anticuerpo que comprende (a) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (b) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 175. En algunos aspectos, HVR-L3 no es **QAAAAAAAT** (SEQ ID NO: 195).

40 En otro aspecto, un anticuerpo como se divulga en el presente documento comprende (a) un dominio VH, que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172, (ii) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173, y (iii) HVR-H3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 174; y (b) un dominio VL, que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, (ii) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 175.

50 En otro aspecto, se divulga un anticuerpo que comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (f) HVR-L3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 175. En algún aspecto, HVR-H2 no es **DMYPDAAAASYNQKFRE** (SEQ ID NO: 193). En algunos aspectos, HVR-H3 no es **APRWAAAA** (SEQ ID NO: 194). En algunos aspectos, HVR-L3 no es **QAAAAAAAT** (SEQ ID NO: 195).

55 Todas las combinaciones posibles de las sustituciones anteriores se engloban por las secuencias consenso de SEQ ID NO: 172, 173, 174 y 175.

60 En cualquiera de los aspectos anteriores, se humaniza un anticuerpo agonista anti-OX40. En un aspecto, un anticuerpo anti-OX40 comprende HVR como en cualquiera de los aspectos anteriores o para cualquiera de los aspectos en las **FIGS. 11A-I**, y comprende además una región estructural humana aceptora, por ejemplo, una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana. En otro aspecto, un anticuerpo anti-OX40 comprende HVR como en cualquiera de los aspectos anteriores y comprende además un VH y/o VL que comprende una secuencia de FR mostrada en las **FIGS. 11A-I**.

65 En otro aspecto, un anticuerpo agonista anti-OX40 humano como se divulga en el presente documento comprende una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de dominio variable de la cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 172, 173, 174 o 175.

95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 108, 114, 116, 183 o 184. En determinados aspectos, una secuencia de VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a OX40. En determinados aspectos, se han sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 108, 114, 116, 183 o 184. En determinados aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende la secuencia de VH en la SEQ ID NO: 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 108, 114, 116, 183 o 184, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un aspecto particular, el VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

En otro aspecto, se divulga un anticuerpo agonista anti-OX40 humano, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 109, 115 o 117. En determinados aspectos, una secuencia de VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a OX40. En determinados aspectos, se han sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 109, 115 o 117. En determinados aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende la secuencia de VL en la SEQ ID NO: 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 109, 115 o 117, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un aspecto particular, el VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (b) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En otro aspecto, un anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56. En determinados aspectos, una secuencia de VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a OX40. En determinados aspectos, se han sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 56. En determinados aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende la secuencia de VH en la SEQ ID NO: 56, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un modo de realización particular, el VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista anti-OX40 humano, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57. En determinados aspectos, una secuencia de VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a OX40. En determinados aspectos, se han sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 57. En determinados aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende la secuencia de VL en la SEQ ID NO: 57, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un aspecto particular, el VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (b) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En otro aspecto, un anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 180. En determinados aspectos, una secuencia de VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %

de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a OX40. En determinados aspectos, se han sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 180. En determinados aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende la secuencia de VH en la SEQ ID NO: 180, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un aspecto particular, el VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista anti-OX40 humano, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 179. En determinados aspectos, una secuencia de VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a OX40. En determinados aspectos, se han sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 179. En determinados aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende la secuencia de VL en la SEQ ID NO: 179, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un modo de realización particular, el VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (b) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En otro aspecto, un anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94. En determinados aspectos, una secuencia de VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a OX40. En determinados aspectos, se han sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 94. En determinados aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende la secuencia de VH en la SEQ ID NO: 94, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un aspecto particular, el VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

En otro aspecto, se divulga un anticuerpo agonista anti-OX40 humano, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95. En determinados aspectos, una secuencia de VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a OX40. En determinados aspectos, se han sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 95. En determinados aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende la secuencia de VL en la SEQ ID NO: 95, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un modo de realización particular, el VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (b) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.

En otro aspecto, un anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96. En determinados aspectos, una secuencia de VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a OX40. En determinados aspectos, se han sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 96. En determinados aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende la secuencia de VH en la SEQ ID NO: 96, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un modo de realización particular, el VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.



En otro aspecto, se divulga un anticuerpo agonista anti-OX40 humano, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97. En determinados aspectos, una secuencia de VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a OX40. En determinados aspectos, se han sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 97. En determinados aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende la secuencia de VL en la SEQ ID NO: 97, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un aspecto particular, el VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (b) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.

En otro aspecto, un anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148. En determinados aspectos, una secuencia de VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a OX40. En determinados aspectos, se han sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148. En determinados aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende la secuencia de VH en la SEQ ID NO: 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un modo de realización particular, el VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, y (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33.

En otro aspecto, se divulga un anticuerpo agonista anti-OX40 humano, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149. En determinados aspectos, una secuencia de VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a OX40. En determinados aspectos, se han sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149. En determinados aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende la secuencia de VL en la SEQ ID NO: 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, incluyendo modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un aspecto particular, el VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; (b) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.

En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 57, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 59, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 61, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 63, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 64 y SEQ ID NO: 65, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 67, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 68 y SEQ ID NO: 69, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 70 y SEQ ID NO: 71, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO: 73, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 74 y SEQ ID NO: 75, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 76 y SEQ ID NO: 77, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de

VH y VL en las SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 79, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 81, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 82 y SEQ ID NO: 83, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 85, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 86 y SEQ ID NO: 87, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 88 y SEQ ID NO: 89, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 90 y SEQ ID NO: 91, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 92 y SEQ ID NO: 93, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 94 y SEQ ID NO: 95, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 96 y SEQ ID NO: 97, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 99, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 100 y SEQ ID NO: 101, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 108 y SEQ ID NO: 109, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 114 y SEQ ID NO: 115, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 117, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 183 y SEQ ID NO: 65, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en las SEQ ID NO: 184 y SEQ ID NO: 69, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista anti-OX40 humano, en el que el anticuerpo comprende un VH, como en cualquiera de los aspectos proporcionados anteriormente, y un VL, como en cualquiera de los aspectos proporcionados anteriormente.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-OX40 humano proporcionado en el presente documento. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo agonista anti-OX40 humano.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-OX40 de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores es un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En un aspecto, un anticuerpo anti-OX40 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o F(ab')<sub>2</sub>. En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 intacto u otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en el presente documento. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4 intacto de longitud completa.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-OX40 de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores puede incorporar cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, como se describe en las secciones 1-7 a continuación:

#### 1. **Afinidad de los anticuerpos**

En determinados aspectos, un anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una constante de disociación (Kd) de  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{ nM}$ ,  $\leq 10 \text{ nM}$ ,  $\leq 1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,01 \text{ nM}$  o  $\leq 0,001 \text{ nM}$  (por ejemplo,  $10^{-8} \text{ M}$  o menos, por ejemplo, de  $10^{-8} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ , por ejemplo, de  $10^{-9} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ ).

En un aspecto, se mide Kd por un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA). En un aspecto, se realiza un RIA con la versión de Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, se mide la afinidad de unión en solución de los Fab por el antígeno equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (<sup>125</sup>I) en presencia de una serie de valoraciones de antígeno no marcado, capturando, a continuación, el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) durante la noche con 5  $\mu\text{g/ml}$  de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) con carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquean con seroalbúmina bovina al 2 % (p/v) en PBS durante de dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (n.º 269620, de Nunc), se mezcla [<sup>125</sup>I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consecuentemente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). A continuación, el Fab de interés

se incubaba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, de aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. Después de esto, se transfieren las mezclas a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, se elimina la solución y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 (TWEEN-20®) al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se hayan secado, se añaden 150 µl/pocillo de centelleador (MICROSCINT-20™; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se eligen concentraciones de cada Fab que dan menos de o igual a un 20 % de unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otro aspecto, se mide Kd usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial en BIACORE®. Por ejemplo, se realiza un ensayo usando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con matrices CM5 con antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En un aspecto, se activan matrices de biosensor con dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de su inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie de dos veces de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) al 0,05 % a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan las tasas de asociación ( $k_{as}$ ) y las tasas de disociación ( $k_{dis}$ ) usando un simple modelo de unión uno a uno de Langmuir (programa informático de evaluación de BIACORE®, versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensoigramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calcula como la proporción  $k_{dis}/k_{as}$ . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la tasa de asociación supera 106 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, a continuación, se puede determinar la tasa de asociación usando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ de la serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

## 2. Fragmentos de anticuerpo

En determinados aspectos, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos a continuación. Para obtener una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.* *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para obtener una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), pp. 269-315 (1994); véanse también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE. UU. n.ºs 5.571.894 y 5.587.458. Para obtener un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> que comprenden residuos de epítopos de unión al receptor de rescate y que tienen una semivida *in vivo* incrementada, véase la patente de EE. UU. n.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados aspectos, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1).

Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo por diversas técnicas que incluyen, pero sin limitarse a, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

## 3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinados aspectos, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Se describen determinados anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de "clase cambiada" en el que se ha cambiado la clase o subclase de la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En determinados aspectos, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, se humaniza un

anticuerpo no humano para reducir la inmunogenicidad con respecto a los seres humanos, mientras que se retienen la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR (o porciones de las mismas), se derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) se derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunos aspectos, se sustituyen algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado con los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los procedimientos de preparación de los mismos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se describen además, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); patentes de EE. UU. n.ºs 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri *et al.*, *Methods* 36:25-34 (2005) (que describen el injerto de regiones determinantes de la especificidad (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (que describe el "rebarajado"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36:43-60 (2005) (que describen el "barajado de FR"); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describen el enfoque de "selección guiada" para el barajado de FR).

Las regiones estructurales humanas que se pueden usar para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones estructurales seleccionadas usando el procedimiento de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims *et al. J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones estructurales derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de la cadena ligera o pesada (véanse, por ejemplo, Carter *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta *et al. J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones estructurales maduras (mutadas somáticamente) humanas o regiones estructurales de la estirpe germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones estructurales derivadas del cribado de colecciones de FR (véanse, por ejemplo, Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

#### 4. Anticuerpos humanos

En determinados aspectos, un anticuerpo es un anticuerpo humano. Se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Se describen, en general, anticuerpos humanos en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se haya modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición antigénica. Dichos animales contienen típicamente todos o una porción de los locus de inmunoglobulina humana, que remplazan los locus de inmunoglobulina endógena, o que están presentes de forma extracromosómica o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los locus de inmunoglobulina endógena, en general, se han inactivado. Para obtener una revisión de los procedimientos para obtener anticuerpos humanos de animales transgénicos, véase Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Véanse también, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 6.075.181 y 6.150.584, que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente de EE. UU. n.º 5.770.429, que describe la tecnología HUMAB®; la patente de EE. UU. n.º 7.041.870, que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®. Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales se pueden modificar adicionalmente, por ejemplo, por combinación con una región constante humana diferente.

También se pueden preparar anticuerpos humanos por procedimientos basados en hibridoma. Se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma humano-murino para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véanse, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)). Los anticuerpos humanos generados por medio de la tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos también se describen en Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Los procedimientos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas de células de hibridoma) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (que describe hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridoma humano (tecnología de trioma) también se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

También se pueden generar anticuerpos humanos aislando secuencias de dominio variable del clon Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de seres humanos. A continuación, se pueden combinar dichas secuencias de dominio variable con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de colecciones de anticuerpos se describen a continuación.

#### 5. Anticuerpos derivados de colecciones

Se pueden aislar los anticuerpos de la invención cribando colecciones combinatorias para determinar anticuerpos con la actividad o actividades deseada(s). Por ejemplo, es conocida en la técnica una variedad de procedimientos para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para determinar los anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos procedimientos se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen además, por ejemplo, en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

En determinados procedimientos de presentación en fagos, los repertorios de genes de VH y VL se clonan por separado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos, que, a continuación, se pueden cribar para determinar el fago de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Los fagos presentan típicamente fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab. Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad con respecto al inmunógeno sin el requerimiento de construir hibridomas. De forma alternativa, se puede clonar el repertorio sin exposición previa (por ejemplo, de un ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para una amplia gama de antígenos propios y no propios sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, también se pueden preparar sintéticamente colecciones sin exposición previa clonando segmentos génicos V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y conseguir el reordenamiento *in vitro*, como se describe por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen colecciones de fagos-anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente de EE. UU. n.º 5.750.373 y las publicaciones de patente de EE. UU. n.ºs 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de colecciones de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo humano en el presente documento.

## 6. Anticuerpos multiespecíficos

En determinados aspectos, un anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinados aspectos, una de las especificidades de unión es por OX40 y la otra es por cualquier otro antígeno. En determinados aspectos, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítomos diferentes de OX40. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos con respecto a las células que expresan OX40. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tengan diferentes especificidades (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), el documento WO 93/08829 y Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), y la genomanipulación por "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.731.168). También se pueden preparar anticuerpos multiespecíficos genomanipulando los efectos de conducción electrostática para preparar moléculas heterodímeras en Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004A1); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.676.980 y Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)); usando cremalleras de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)); usando la tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros en Fv monocatenarios (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

En el presente documento también se incluyen anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos pulpo" (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye un "Fab de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a OX40, así como otro antígeno diferente (véase, el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

## 7. Variantes de anticuerpo

En determinados aspectos, se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se pueden preparar variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de

nucleótidos que codifica el anticuerpo o por síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

5 **a) Variantes de sustitución, inserción y deleción**

En determinados aspectos, se divulgan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. Se muestran sustituciones conservadoras en la tabla A bajo el encabezamiento de "sustituciones preferentes". Se proporcionan cambios más sustanciales en la tabla A bajo el encabezamiento de "sustituciones ejemplares" y como se describe además a continuación en referencia a las clases de cadenas laterales de aminoácido. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y cribar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno retenida/mejorada, inmunogenicidad disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

15 **TABLA A**

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con propiedades de cadena lateral comunes:

- 20 (1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 25 (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- 30 (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

35 Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para su estudio adicional tendrá(n) modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada, inmunogenicidad reducida) con respecto al anticuerpo original y/o habrá(n)

retenido sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo madurado en afinidad, que se puede generar convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de la afinidad basadas en presentación en fagos, tales como las descritas en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más residuos de HVR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se criban para determinar una actividad biológica particular (por ejemplo, la afinidad de unión).

Se pueden realizar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad de los anticuerpos. Dichas alteraciones se pueden realizar en "puntos calientes" de HVR, es decir, residuos codificados por codones que se someten a mutación con alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), y/o residuos que contactan con el antígeno, sometiendo a prueba el VH o VL variante resultante para determinar la afinidad de unión. La maduración de la afinidad por construcción y reelección de colecciones secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) En algunos aspectos de la maduración de la afinidad, se introduce diversidad en los genes variables elegidos para la maduración por cualquiera de una variedad de procedimientos (por ejemplo, PCR propensa a error, reordenamiento de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación, se crea una segunda colección. A continuación, se criba la colección para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro procedimiento para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se aleatorizan varios residuos de HVR (por ejemplo, 4-6 residuos a la vez). Se pueden identificar específicamente los residuos de HVR implicados en la unión a antígeno, por ejemplo, usando mutagénesis o modelado por barrido de alanina. A menudo se seleccionan como diana en particular CDR-H3 y CDR-L3.

En determinados aspectos, se pueden producir sustituciones, inserciones o deleciones en una o más HVR, siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden realizar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporciona en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Dichas alteraciones pueden estar, por ejemplo, fuera de los residuos en contacto con el antígeno en las HVR. En determinados aspectos de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada o bien no contiene más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que se pueden seleccionar como diana para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este procedimiento se identifican un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como as arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes se pueden seleccionar como diana o eliminar como candidatos para la sustitución. Se pueden cribar las variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácido únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que incrementa la semivida en suero del anticuerpo.

#### **b) Variantes de glucosilación**

En determinados aspectos, se altera un anticuerpo proporcionado en el presente documento para incrementar o disminuir el grado en el que el anticuerpo se glucosila. La adición o deleción de sitios de glucosilación a un anticuerpo se puede conseguir convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se cree o elimine uno o más sitios de glucosilación.

Si el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido a la misma. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que se une, en general, por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright *et al.* *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunos aspectos, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

En un aspecto, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser de un 1 % a un 80 %, de un 1 % a un 65 %, de un 5 % a un 65 % o de un 20 % a un 40 %. La cantidad de fucosa

se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con respecto a la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) como se mide por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2008/077546. Asn297 se refiere al residuo de asparagina localizado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración Eu de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también se puede localizar aproximadamente  $\pm 3$  aminoácidos en dirección 5' o en dirección 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia despreciables en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función ADCC mejorada. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE. UU. n.ºs US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosilado" o "carente de fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki *et al. J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec 13 carentes de fucosilación de proteínas (Ripka *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); la sol. de pat. de EE. UU. n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L.; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el ejemplo 11) y líneas celulares con genes inactivados, tales como el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO con genes inactivados (véanse, por ejemplo, Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al., Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); y el documento WO2003/085107).

Se divulgan además variantes de anticuerpo con oligosacáridos bisecados, por ejemplo, en los que un oligosacárido biantenarío unido a la región Fc del anticuerpo se biseca por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una fucosilación reducida y/o función ADCC mejorada. Los ejemplos de dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); la patente de EE. UU. n.º 6.602.684 (Umana *et al.*); y el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 1997/30087 (Patel *et al.*); el documento WO 1998/58964 (Raju, S.); y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.).

### c) Variantes de la región Fc

En determinados aspectos, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprenda una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

En determinados aspectos, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas, las funciones efectoras, que le convierten en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* sea importante, aunque determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y la ADCC) sean innecesarias o perjudiciales. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/diminución de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos de unión al receptor Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carezca de unión a FcγR (de ahí que probablemente carezca de actividad ADCC), pero retenga su capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, solo expresan Fc(RIII), mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII). La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Se describen ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 (véanse, por ejemplo, Hellstrom, I. *et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I *et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al., J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayo no radioactivo (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI))). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citotóxicos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar la actividad ADCC de la molécula de interés *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el divulgado en Clynes *et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no se puede unir a C1q y, de ahí que carezca de actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al., J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. *et al., Blood* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). También se pueden realizar la unión a FcRn y determinaciones de la eliminación/semivida *in vivo* usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. *et al., Int'l. Immunol.* 18(12): 1759-1769 (2006)).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de la



región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de EE. UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes con respecto a Fc incluyen mutantes con respecto a Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante con respecto a Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 con alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581).

5 Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión mejorada o reducida a los FcR. (Véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.737.056; el documento WO 2004/056312 y Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)).

10 En determinados aspectos, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de los residuos).

15 En algunos aspectos, las alteraciones se realizan en la región Fc, que dan como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas (es decir, mejoradas o reducidas), por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551, el documento WO 99/51642 e Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

20 En el documento US 2005/0014934A1 (Hinton *et al.*) se describen anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo 434 de la región Fc (patente de EE. UU. n.º 7.371.826).

Véanse también Duncan y Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); la patente de EE. UU. n.º 5.648.260; la patente de EE. UU. n.º 5.624.821; y el documento WO 94/29351 en relación con otros ejemplos de variantes de la región Fc.

#### 30 **d) Variantes de anticuerpo genomanipulado con cisteína**

En determinados aspectos, puede ser deseable crear anticuerpos genomanipulados con cisteína, por ejemplo, "thioMAb", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En aspectos particulares, se producen los residuos sustituidos en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo esos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se sitúan de este modo en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para 35 conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, para crear un inmunocombinado, como se describe adicionalmente en el presente documento. En determinados aspectos, se puede sustituir uno cualquiera o más de los siguientes residuos con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Se pueden generar anticuerpos genomanipulados con cisteína como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.521.541.

#### 45 **e) Derivados de anticuerpo**

En determinados aspectos, se puede modificar adicionalmente un anticuerpo para que contenga restos no proteicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhidrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)/polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El polietilenglicol-propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se une más de un polímero, pueden ser las mismas moléculas o diferentes. En general, se puede determinar el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización en base a consideraciones, que incluyen, pero sin limitarse a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se van a mejorar, independientemente de si el derivado de anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

60 En otro aspecto, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteico que se pueden calentar de forma selectiva por exposición a radiación. En un modo de realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, pero no se limita a, las longitudes de onda que no dañan a las células normales, pero que calientan el resto no proteico a una temperatura en la que se destruyen las células proximales al anticuerpo-resto no proteico.

**B. Procedimientos y composiciones recombinantes**

Se pueden producir anticuerpos usando procedimientos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567. En un modo de realización, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-OX40 descrito en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En otro aspecto, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En otro aspecto, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En un modo de realización de este tipo, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En un aspecto, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o célula linfática (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En un aspecto, se proporciona un procedimiento de preparación de un anticuerpo anti-OX40, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula huésped (o medio de cultivo de células huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-OX40, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describe anteriormente, se aísla e inserta en uno o más vectores para su clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para la clonación o la expresión de vectores que codifican el anticuerpo incluyen las células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos en bacterias, en particular, cuando no se necesitan glucosilación ni la función efectora por Fc. Para la expresión de los fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de su expresión, se puede aislar el anticuerpo de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos y levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras en las que sus vías de glucosilación se han "humanizado", lo que da como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véanse Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), y Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también se derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus, que se pueden usar junto con células de insecto, en particular, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas de células de mamífero que se adapten a su cultivo en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293, como se describe, por ejemplo, en Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TR1, como se describe, por ejemplo, en Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR<sup>-</sup> (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas de células de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para obtener una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

**C. Ensayos**

Los anticuerpos anti-OX40 proporcionados en el presente documento se pueden identificar, cribar para determinar o caracterizar para determinar sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

5

### 1. *Ensayos de unión y otros ensayos*

En un aspecto, se somete a prueba un anticuerpo de la invención para determinar su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, por procedimientos conocidos, tales como ELISA, inmunolectrotransferencia, etc. Se puede determinar la unión de OX40 usando procedimientos conocidos en la técnica y en el presente documento se divulgan procedimientos ejemplares. En un modo de realización, se mide la unión usando radioinmunoanálisis. Se ejemplifica un radioinmunoanálisis ejemplar en los ejemplos. El anticuerpo frente a OX40 se yoda y se preparan mezclas de reacción de competencia que contienen una concentración fijada de anticuerpo yodado y concentraciones decrecientes de anticuerpo frente a OX40 no marcado diluido en serie. Se añaden células que expresan OX40 (por ejemplo, células BT474 transfectadas de forma estable con OX40 humano) a la mezcla de reacción. Después de una incubación, se lavan las células para separar el anticuerpo frente a OX40 yodado libre del anticuerpo frente a OX40 unido a las células. Se determina el nivel de anticuerpo frente a OX40 yodado unido, por ejemplo, contando la radioactividad asociada con las células, y la afinidad de unión determinada usando procedimientos estándar. En otro aspecto, se evalúa la capacidad del anticuerpo frente a OX40 de unirse a OX40 expresado en la superficie (por ejemplo, en subconjuntos de linfocitos T) usando citometría de flujo. Se obtienen glóbulos blancos periféricos (por ejemplo, de ser humano, de macaco cangrejero, de rata o de ratón) y se bloquean las células con suero. Se añade el anticuerpo frente a OX40 marcado en diluciones en serie y también se tiñen linfocitos T para identificar subconjuntos de linfocitos T (usando procedimientos conocidos en la técnica). Después de la incubación de las muestras y el lavado, se clasifican las células usando un citómetro de flujo y los datos se analizan usando procedimientos bien conocidos en la técnica. En otro aspecto, se puede analizar la unión de OX40 usando resonancia de plasmón superficial. Un ejemplo de procedimiento de resonancia de plasmón superficial se ejemplifica en los ejemplos.

En otro aspecto, se pueden usar ensayos de competencia para identificar un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos anti-OX40 divulgados en el presente documento por su unión a OX40. En determinados aspectos, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) que está unido por cualquiera de los anticuerpos anti-OX40 divulgados en el presente documento. Se proporcionan procedimientos ejemplares detallados para cartografiar un epítipo al que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Un ensayo de competencia se ejemplifica en los ejemplos.

En un ensayo de competencia ejemplar, se incuban OX40 inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a OX40 (por ejemplo, mab 1A7.gr.1, mab 3C8.gr5) y un segundo anticuerpo no marcado que se somete a prueba para determinar su capacidad de competir con el primer anticuerpo por su unión a OX40. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuban OX40 inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de su incubación, en condiciones que permitan la unión del primer anticuerpo a OX40, se elimina el anticuerpo no unido en exceso y se mide la cantidad de marcador asociado con OX40 inmovilizado. Si se reduce sustancialmente la cantidad de marcador asociado con OX40 inmovilizado en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control, entonces, eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por su unión a OX40. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

### 2. *Ensayos de actividad*

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-OX40 de los mismos que tengan actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la unión a OX40 (por ejemplo, la unión a OX40 humano y/o de macaco cangrejero), el incremento de la transducción de señales mediada por OX40 (por ejemplo, el incremento de la transcripción mediada por NFκB), la disminución de las células que expresan OX40 humano (por ejemplo, los linfocitos T), la disminución de las células que expresan OX40 humano por ADCC y/o fagocitosis, la potenciación de la función de los linfocitos T efectoras (por ejemplo, los linfocitos T efectoras CD4+), por ejemplo, incrementando la proliferación de linfocitos T efectoras y/o incrementando la producción de citocinas (por ejemplo, interferón gamma) por los linfocitos T efectoras, la potenciación de la función de los linfocitos T de memoria (por ejemplo, los linfocitos T de memoria CD4+), por ejemplo, incrementando la proliferación de linfocitos T de memoria y/o incrementando la producción de citocinas por los linfocitos T de memoria (por ejemplo, interferón gamma), la inhibición de la función de los linfocitos T reguladores (por ejemplo, disminuyendo la supresión por Treg de la función de los linfocitos T efectoras (por ejemplo, la función de los linfocitos T efectoras CD4+), la unión a células efectoras humanas. También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

En determinados aspectos, se somete a prueba un anticuerpo de la invención para determinar dicha actividad biológica.

65

Se puede someter a ensayo la coestimulación de linfocitos T usando procedimientos conocidos en la técnica y en el presente documento se divulgan procedimientos ejemplares. Por ejemplo, se pueden obtener linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T de memoria o efectores) de glóbulos blancos periféricos (por ejemplo, aislados de sangre completa humana usando centrifugación en gradiente de Ficoll). Se pueden aislar linfocitos T de memoria (por ejemplo, linfocitos T de memoria CD4+) o linfocitos T efectores (por ejemplo, linfocitos Tef CD4+) de PBMC usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar el kit de aislamiento de linfocitos T de memoria CD4+ de Miltenyi o el kit de aislamiento de linfocitos T CD4+ indiferenciados de Miltenyi. Se cultivan linfocitos T aislados en presencia de células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células L irradiadas que expresan CD32 y CD80) y se activan por adición de anticuerpo anti-CD3 en presencia o ausencia de anticuerpo agonista frente a OX40. Se puede medir el efecto del anticuerpo frente a OX40 agonista de la proliferación de linfocitos T usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar el kit CellTiter Glo (Promega) y se pueden leer los resultados en un lector de múltiples marcadores (Perkin Elmer). También se puede determinar el efecto del anticuerpo frente a OX40 agonista sobre la función de los linfocitos T por análisis de las citocinas producidas por el linfocito T. En un modo de realización, se determina la producción de interferón gamma por los linfocitos T CD4+, por ejemplo, por medición de interferón gamma en el sobrenadante de cultivo celular. Los procedimientos para medir el interferón gamma son bien conocidos en la técnica.

Se puede someter a ensayo la función de los linfocitos Treg usando procedimientos conocidos en la técnica y en el presente documento se divulgan procedimientos ejemplares. En un ejemplo, se somete a ensayo la capacidad de Treg de suprimir la proliferación de linfocitos T efectores. Se aíslan linfocitos T de sangre completa humana usando procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, aislando linfocitos T de memoria o linfocitos T indiferenciados). Se marcan (por ejemplo, con CFSE) linfocitos T CD4+ indiferenciados purificados y se marcan linfocitos Treg purificados con un reactivo diferente. Se cocultivan células presentadoras de antígeno irradiadas (por ejemplo, células L que expresan CD32 y CD80) con linfocitos T CD4+ indiferenciados purificados y Treg purificados marcados. Se activan los cocultivos usando el anticuerpo anti-CD3 y se someten a prueba en presencia o ausencia del anticuerpo frente a OX40 agonista. Después de un tiempo adecuado (por ejemplo, 6 días de cocultivo), se realiza un seguimiento del nivel de proliferación de linfocitos T indiferenciados CD4+ por dilución de colorante en tinción reducida con marcador (por ejemplo, tinción reducida con marcador CFSE) usando análisis por FACS.

Se puede someter a ensayo la señalización por OX40 usando procedimientos bien conocidos en la técnica y en el presente documento se divulgan procedimientos ejemplares. En un aspecto, se generan células transgénicas que expresan OX40 humano y un gen indicador que comprende el promotor de NFkB fusionado a un gen indicador (por ejemplo, beta luciferasa). La adición del anticuerpo agonista frente a OX40 a las células da como resultado una transcripción por NFkB incrementada, que se detecta usando un ensayo para el gen indicador.

Se puede someter a ensayo la fagocitosis, por ejemplo, usando macrófagos derivados de monocitos o células U937 (una línea de células de linfoma histiocítico humano con la morfología y características de los macrófagos maduros). Se añaden células que expresan OX40 a los macrófagos derivados de monocitos o células U937 en presencia o ausencia de anticuerpo agonista anti-OX40. Después del cultivo de las células durante un periodo de tiempo adecuado, se determina el porcentaje de fagocitosis examinando el porcentaje de células que duplican la tinción para los marcadores 1) del macrófago o célula U937 y 2) de la célula que expresa OX40, y dividiendo esto entre el número total de células que muestran marcadores de la célula que expresa OX40 (por ejemplo, GFP). Se puede hacer el análisis por citometría de flujo. En otro aspecto, se puede hacer el análisis por análisis de microscopía fluorescente.

Se puede someter a ensayo la ADCC, por ejemplo, usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Se describen procedimientos ejemplares en la sección de definiciones y se divulga un ensayo ejemplar en los ejemplos. En algunos aspectos, se caracteriza el nivel de OX40 en una célula que expresa OX40 que se usa para las pruebas en un ensayo de ADCC. La célula se puede teñir con un anticuerpo anti-OX40 marcado de forma detectable (por ejemplo, marcado con PE), a continuación, se puede determinar el nivel de fluorescencia usando citometría de flujo, y los resultados se pueden presentar como la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF). En otro aspecto, se puede analizar la ADCC por el kit de ensayo CellTiter Glo y se puede determinar la viabilidad/citotoxicidad celular por quimioluminiscencia.

Las afinidades de unión de diversos anticuerpos a FcγRIA, FcγRIIA, FcγRIIB y dos alotipos de FcγRIIIA (F158 y V158) se pueden medir en ensayos de unión a ligando basados en ELISA usando los receptores Fcγ recombinantes respectivos. Los receptores Fcγ humanos purificados se expresan como proteínas de fusión que contienen el dominio extracelular de la cadena y del receptor enlazada a una marca polipeptídica Gly/6xHis/glutatio S-transferasa (GST) en el extremo C. Las afinidades de unión de los anticuerpos a esos receptores Fcγ humanos se someten a ensayo como sigue. Para los receptores de baja afinidad, es decir, FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B) y los dos alotipos de FcγRIIIA (CD16), F-158 y V-158, se pueden someter a prueba los anticuerpos como multímeros por reticulación con un fragmento F(ab')<sub>2</sub> de anti cadena kappa humana caprino (ICN Biomedical; Irvine, CA) en una proporción molar aproximada de 1:3 de anticuerpo:F(ab')<sub>2</sub> de reticulación. Se recubren las placas con un anticuerpo anti-GST (Genentech) y se bloquean con seroalbúmina bovina (BSA). Después del lavado con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene Tween-20 al 0,05 % con un lavador de placas ELx405™ (Biotek Instruments; Winooski, VT), se añaden receptores Fcγ a la placa a 25 ng/pocillo y se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de que se lavan las placas, se añaden diluciones en serie de anticuerpos de prueba como complejos multímeros y se

incubaban las placas a temperatura ambiente durante 2 horas. Después del lavado de la placa para eliminar los anticuerpos no unidos, los anticuerpos unidos al receptor Fcγ se detectan con peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada al fragmento F(ab')<sub>2</sub> de anti-F(ab')<sub>2</sub> humano caprino (Jackson Immuno Research Laboratories; West Grove, PA) seguido de la adición de sustrato, tetrametilbencidina (TMB) (Kirkegaard & Perry Laboratories; Gaithersburg, MD).  
 5 Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 5-20 minutos, dependiendo de los receptores de Fcγ sometidos a prueba, para permitir el desarrollo del color. La reacción se termina con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M y se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (SpectraMax<sup>®</sup>190, Molecular Devices; Sunnyvale, CA). Se generan curvas de unión de respuesta a la dosis trazando los valores de absorbancia medios de los duplicados de las diluciones de anticuerpos frente a las concentraciones del anticuerpo. Se determinaron los valores para la concentración eficaz del anticuerpo a la que se detecta un 50 % de la respuesta máxima de unión al receptor Fcγ (CE<sub>50</sub>) después de ajustar la curva de unión con una ecuación de cuatro parámetros usando SoftMax Pro (Molecular Devices).

Para seleccionar los anticuerpos que inducen la muerte celular, se puede evaluar la pérdida de integridad de la membrana, como se indica, por ejemplo, por absorción de yoduro de propidio (PI), azul tripano o 7AAD con respecto al control. Se puede realizar un ensayo de absorción de PI en ausencia de células efectoras del complemento e inmunitarias. Las células que expresan OX40 se incuban solo con medio o medio que contiene el anticuerpo monoclonal apropiado, por ejemplo, a aproximadamente 10 µg/ml. Las células se incuban durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 1 o 3 días). Después de cada tratamiento, las células se lavan y se dividen en alícuotas. En algunos aspectos, las células se dividen en alícuotas en tubos de 12 x 75 con tapa de filtro de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la eliminación de los grupos de células. A continuación, los tubos reciben PI (10 µg/ml). Se pueden analizar las muestras usando un citómetro de flujo FACSCAN<sup>™</sup> y el programa informático FACSCONVERT<sup>™</sup> CellQuest (Becton Dickinson).

Las células para su uso en cualquiera de los ensayos *in vitro* anteriores incluyen células o líneas celulares que expresan de forma natural OX40 o que se han genomanipulado para expresar OX40. Dichas células incluyen linfocitos T activados, linfocitos Treg y linfocitos T de memoria activados que expresan de forma natural OX40. Dichas células también incluyen líneas celulares que expresan OX40 y líneas celulares que normalmente no expresan OX40, pero que se han transfectado con ácido nucleico que codifica OX40. Las líneas celulares ejemplares proporcionadas en el presente documento para su uso en cualquiera de los ensayos *in vitro* anteriores incluyen células BT474 transgénicas (una línea de células de cáncer de mama humano) que expresan OX40 humano.

Se entiende que cualquiera de los ensayos anteriores se puede llevar a cabo usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-OX40.

Se entiende que cualquiera de los ensayos anteriores se puede llevar a cabo usando anticuerpo anti-OX40 y un agente terapéutico adicional.

#### D. Inmunoconjugados

La invención también proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-OX40 en el presente documento conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de las mismas) o isótopos radioactivos.

En un aspecto, un inmunoconjugado es un conjugado anticuerpo-fármaco (CAF) en el que un anticuerpo se conjuga a uno o más fármacos, incluyendo, pero sin limitarse a, un maitansinoide (véanse las patentes de EE. UU. n.<sup>os</sup> 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina, tal como los restos del fármaco monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (véanse las patentes de EE. UU. n.<sup>os</sup> 5.635.483 y 5.780.588 y 7.498.298); una dolastatina; una caliqueamicina o derivado de la misma (véanse las patentes de EE. UU. n.<sup>os</sup> 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296; Hinman *et al.*, *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); y Lode *et al.*, *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); una antraciclina, tal como daunomicina o doxorubicina (véanse Kratz *et al.*, *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey *et al.*, *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov *et al.*, *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik *et al.*, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King *et al.*, *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); y la patente de EE. UU. n.<sup>o</sup> 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano, tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otro aspecto, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, incluyendo, pero sin limitarse a, la cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otro aspecto, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento

conjugado a un átomo radioactivo para formar un radioconjugado. Está disponible una variedad de isótopos radioactivos para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> e isótopos radioactivos de Lu. Cuando se usa el radioconjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios gammagráficos, por ejemplo, tc99m o I123, o un marcador de espín para resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como resonancia magnética, RM), tal como yodo-123, de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Se pueden preparar conjugados de un anticuerpo y agente citotóxico usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina, como se describe en Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionúclido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilite la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil en ácido, conector sensible a peptidasa, conector fotolábil, conector de dimetilo o conector que contiene disulfuro (Chari *et al.*, *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); patente de EE. UU. n.º 5.208.020).

Los inmunoconjugados o CAF en el presente documento contemplan expresamente, pero no se limitan a, dichos conjugados preparados con reactivos de reticulación, incluyendo, pero sin limitarse a, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB ((4-vinilsulfona)benzoato de succinimidilo), que están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.).

#### **E. Procedimientos y composiciones para el diagnóstico y la detección**

En determinados aspectos, cualquiera de los anticuerpos anti-OX40 proporcionados en el presente documento es útil para detectar la presencia de OX40 en una muestra biológica. El término "detectar" como se usa en el presente documento engloba la detección cuantitativa o cualitativa. En determinados aspectos, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como una muestra de un tumor (por ejemplo, CPNM o tumor en la mama).

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-OX40 para su uso en un procedimiento de diagnóstico o detección. En otro aspecto, se proporciona un procedimiento de detección de la presencia de OX40 en una muestra biológica. En determinados aspectos, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-OX40 como se describe en el presente documento en condiciones que permitan la unión del anticuerpo anti-OX40 a OX40 y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-OX40 y OX40. Dicho procedimiento puede ser un procedimiento *in vitro* o *in vivo*. En un aspecto, se usa un anticuerpo anti-OX40 para seleccionar sujetos idóneos para el tratamiento con un anticuerpo anti-OX40, por ejemplo, si OX40 es un biomarcador para la selección de pacientes.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-OX40 para su uso en un procedimiento de diagnóstico o detección es un anticuerpo anti-OX40 humano que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-OX40 comprende (a) un dominio VH, que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, (ii) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y (iii) HVR-H3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4; y (b) un dominio VL, que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, (ii) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En algunos aspectos, el anticuerpo frente a OX40 comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (f) HVR-L3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 7. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 180. En determinados aspectos, una secuencia de VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a OX40. En determinados aspectos, se han sustituido, insertado y/o

delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 180. En determinados aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende la secuencia de VH en la SEQ ID NO: 180, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un aspecto particular, el VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 179. En determinados aspectos, una secuencia de VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a OX40. En determinados aspectos, se han sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 179. En determinados aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende la secuencia de VL en la SEQ ID NO: 179, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un aspecto particular, el VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (b) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-OX40 usado en el procedimiento de diagnóstico o detección es un anticuerpo anti-OX40 humano que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-OX40 comprende (a) un dominio VH, que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, (ii) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, y (iii) HVR-H3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 31; y (b) un dominio VL, que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37, (ii) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39, y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-OX40 comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; y (f) HVR-L3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 42. En algún modo de realización, el anticuerpo anti-OX40 comprende una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 182. En determinados aspectos, una secuencia de VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a OX40. En determinados aspectos, se han sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 182. En determinados aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende la secuencia de VH en la SEQ ID NO: 182, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un aspecto particular, el VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, y (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-OX40 comprende un dominio variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 181. En determinados aspectos, una secuencia de VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a OX40. En determinados aspectos, se han sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 181. En determinados aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano comprende la secuencia de VL en la SEQ ID NO: 181, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un modo de realización particular, el VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; (b) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-OX40 comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 180. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-OX40 comprende una secuencia de VL de SEQ ID NO: 179. En algunos aspectos, el

anticuerpo anti-OX40 comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 180 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 179. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-OX40 comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 182. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-OX40 comprende una secuencia de VL de SEQ ID NO: 181. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-OX40 comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 182 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 181.

Los trastornos ejemplares que se pueden diagnosticar usando un anticuerpo de la invención incluyen cáncer.

En determinados aspectos, se proporcionan anticuerpos anti-OX40 marcados. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, electrodensos, quimioluminiscentes y radioactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  y  $^{131}\text{I}$ , fluoróforos, tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de EE. UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante, tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

En un aspecto, la invención proporciona procedimientos de diagnóstico, por ejemplo, para identificar a un paciente con cáncer que probablemente responda al tratamiento con un anticuerpo agonista anti-OX40 humano.

En algunos aspectos, se proporcionan procedimientos para identificar a pacientes que probablemente respondan al tratamiento con un anticuerpo agonista anti-OX40 humano, comprendiendo los procedimientos (i) determinar la presencia o ausencia o cantidad (por ejemplo, número por tamaño de muestra dado) de células que expresan FcR en una muestra de cáncer del paciente y (ii) identificar al paciente como que probablemente responda si la muestra comprende células que expresan FcR (por ejemplo, alto número de células que expresan FcR). Los procedimientos para detectar células que expresan FcR son bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, por IHQ. En algunos aspectos, FcR es Fc $\gamma$ R. En algunos aspectos, FcR es un Fc $\gamma$ R activador. En algunos aspectos, el cáncer es cualquier cáncer descrito en el presente documento. En algunos aspectos, el cáncer es carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), glioblastoma, neuroblastoma, melanoma, carcinoma de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CCR) o carcinoma hepatocelular. En algunos aspectos, el procedimiento es un procedimiento *in vitro*. En algunos aspectos, los procedimientos comprenden además (iii) recomendar un tratamiento con el anticuerpo agonista anti-OX40 humano (por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano descritos en el presente documento). En algunos aspectos, los procedimientos comprenden además (iv) tratar al paciente con el anticuerpo agonista anti-OX40 humano.

En algunos aspectos, se proporcionan procedimientos para identificar a pacientes que probablemente respondan al tratamiento con un anticuerpo agonista anti-OX40 humano, comprendiendo los procedimientos (i) determinar la presencia o ausencia o cantidad (por ejemplo, número por tamaño de muestra dado) de células efectoras humanas (por ejemplo, células efectoras infiltrantes) en una muestra de cáncer del paciente y (ii) identificar al paciente como que probablemente responda si la muestra comprende células efectoras (por ejemplo, alto número de células efectoras). Los procedimientos para detectar células efectoras humanas infiltrantes son bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, por IHQ. En algunos aspectos, las células efectoras humanas son una o más de linfocitos NK, macrófagos, monocitos. En algunos aspectos, las células efectoras expresan el Fc $\gamma$ R activador. En algunos aspectos, el procedimiento es un procedimiento *in vitro*. En algunos aspectos, el cáncer es cualquier cáncer descrito en el presente documento. En algunos aspectos, el cáncer es carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), glioblastoma, neuroblastoma, melanoma, carcinoma de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CCR) o carcinoma hepatocelular. En algunos aspectos, los procedimientos comprenden además (iii) recomendar un tratamiento con el anticuerpo agonista anti-OX40 humano (por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano descritos en el presente documento). En algunos aspectos, los procedimientos comprenden además (iv) tratar al paciente con el anticuerpo agonista anti-OX40 humano.

Se proporcionan procedimientos para proporcionar un diagnóstico de cáncer que comprenden: (i) medir las células que expresan FcR (por ejemplo, el nivel o presencia o ausencia de o prevalencia (por ejemplo, el porcentaje de células que expresan FcR, por ejemplo, por IHQ) de FcR) en una muestra del paciente; (ii) diagnosticar que el paciente tiene cáncer que comprende el biomarcador de FcR (por ejemplo, alta concentración de biomarcador de FcR) cuando la muestra tiene expresión de biomarcador de FcR. En algunos aspectos, el procedimiento comprende además (iii) seleccionar un tratamiento que comprende (a) un anticuerpo agonista anti-OX40 humano o (b) recomendar un tratamiento que comprende un anticuerpo agonista anti-OX40 humano para el paciente. En algunos aspectos, el procedimiento es un procedimiento *in vitro*.

Se proporcionan procedimientos para proporcionar un diagnóstico de cáncer que comprenden: (i) medir las células efectoras humanas (por ejemplo, el nivel o presencia o ausencia de o prevalencia (por ejemplo, el porcentaje de células



efectoras humanas) de células efectoras humanas) en una muestra del paciente; (ii) diagnosticar que el paciente tiene cáncer que comprende células efectoras humanas (por ejemplo, alta concentración de células efectoras humanas) cuando la muestra tiene biomarcador de células efectoras humanas. En algunos aspectos, el procedimiento comprende además (iii) seleccionar un tratamiento que comprende (a) un anticuerpo agonista anti-OX40 humano o (b) recomendar un tratamiento que comprende un anticuerpo agonista anti-OX40 humano para el paciente. En algunos aspectos, el procedimiento es un procedimiento *in vitro*.

Se proporcionan procedimientos de recomendación de un tratamiento a un paciente con cáncer que comprenden: (i) medir las células que expresan FcR (por ejemplo, el nivel o presencia o ausencia de o prevalencia (por ejemplo, el porcentaje de células que expresan FcR) de FcR) en una muestra del paciente; (ii) recomendar el tratamiento con un anticuerpo agonista anti-OX40 humano cuando la muestra tiene células que expresan FcR (en algunos aspectos, alta concentración de células que expresan FcR). En algunos aspectos, el procedimiento comprende además (iii) seleccionar un tratamiento que comprende un anticuerpo agonista anti-OX40 humano para el paciente. En algunos aspectos, el procedimiento es un procedimiento *in vitro*.

Se proporcionan procedimientos de recomendación de un tratamiento a un paciente con cáncer que comprenden: (i) medir las células efectoras humanas (por ejemplo, el nivel o presencia o ausencia de o prevalencia (por ejemplo, el porcentaje de células efectoras humanas) de células efectoras humanas) en una muestra del paciente; (ii) recomendar el tratamiento con un anticuerpo agonista anti-OX40 humano cuando la muestra tiene células efectoras humanas (en algunos aspectos, alta concentración de células efectoras humanas). En algunos aspectos, el procedimiento comprende además (iii) seleccionar un tratamiento que comprende un anticuerpo agonista anti-OX40 humano para el paciente. En algunos aspectos, el procedimiento es un procedimiento *in vitro*.

En algunos aspectos de cualquiera de las invenciones proporcionadas en el presente documento, se obtiene la muestra antes del tratamiento con el anticuerpo agonista anti-OX40 humano. En algunos aspectos, se obtiene la muestra antes del tratamiento con un medicamento contra el cáncer. En algunos aspectos, se obtiene la muestra después de que el cáncer haya metastatizado. En algunos aspectos, la muestra está fijada con formol e incluida en parafina (FFPE). En algunos aspectos, la muestra es de una biopsia (por ejemplo, una biopsia con aguja gruesa), una muestra quirúrgica (por ejemplo, una muestra de una resección quirúrgica) o un aspirado con aguja fina.

## F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-OX40 como se describe en el presente documento se preparan mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables, en general, no son tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen, pero no se limitan a: tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos, tales como metil- o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además agentes de dispersión intersticial de fármacos, tales como glucoproteínas de hialuronidasa activa a pH neutro soluble (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tales como rHuPH20 (HYLENEX<sup>®</sup>, Baxter International, Inc.). Se describen determinadas sHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rHuPH20, en las publicaciones de patente de EE. UU. n.ºs 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, se combina una sHASEGP con una o más glucosaminoglucanasas adicionales, tales como condroitinasas.

En algunos aspectos, un "tampón histidina" es un tampón que comprende iones de histidina. Los ejemplos de tampones histidina incluyen cloruro de histidina, acetato de histidina, fosfato de histidina, sulfato de histidina. Se descubrió que el tampón histidina preferente identificado en los ejemplos en el presente documento era acetato de histidina. En el aspecto preferente, se prepara el tampón acetato de histidina valorando L-histidina (base libre, sólida) con ácido acético (líquido). En algunos aspectos, el tampón histidina o tampón acetato de histidina está a pH de 5,0 a 6,0, en algunos aspectos, pH de 5,3 a 5,8.

En algunos aspectos, un "sacárido" en el presente documento comprende la composición general (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> y derivados de la misma, incluyendo monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos, alditoles, azúcares reductores, azúcares no reductores, etc. Los ejemplos de sacáridos en el presente documento incluyen glucosa, sacarosa, trehalosa, lactosa, fructosa, maltosa, dextrano, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol, manitol, melibiosa, melecitosa, rafinosa, manotriosa, estaquiosa, maltosa, lactulosa, maltulosa, glucitol, maltitol, lactitol, isomaltulosa, etc. En algunos aspectos, el sacárido es un disacárido no reductor, tal como trehalosa o sacarosa.

En algunos aspectos en el presente documento, un "tensoactivo" se refiere a un agente activo en superficie, preferentemente un tensoactivo no iónico. Los ejemplos de tensoactivos en el presente documento incluyen polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80); poloxámero (por ejemplo, poloxámero 188); Triton; dodecilsulfato de sodio (SDS); laurilsulfato de sodio; octilglucósido de sodio; lauril, miristil, linoleil o estearilsulfobetaína; lauril, miristil, linoleil o estearilsarcosina; linoleil, miristil o cetilbetaína; lauroamidopropil, cocamidopropil, linoleamidopropil, miristamidopropil, palmidopropil o isostearamidopropilbetaína (por ejemplo, lauroamidopropil); miristamidopropil, palmidopropil o isostearamidopropildimetilamina; metilcocoilaurato sódico o metiloleilaurato disódico; y la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, Nueva Jersey); polietilglicol, polipropilglicol y copolímeros de etileno y propilenglicol (por ejemplo, Pluronic, PF68 etc.); etc. En algunos aspectos, el tensoactivo es polisorbato 20. En algunos aspectos, el tensoactivo es polisorbato 80.

Se describen formulaciones de anticuerpos liofilizadas ejemplares en la patente de EE. UU. n.º 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen las descritas en la patente de EE. UU. n.º 6.171.586 y en el documento WO 2006/044908, incluyendo estas últimas formulaciones un tampón acetato de histidina.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un ingrediente activo, según sea necesario, para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se vean afectadas de forma adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un medicamento adicional (los ejemplos del cual se proporcionan en el presente documento). Dichos ingredientes activos están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que sean eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación prolongada. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* son, en general, estériles. Se puede conseguir fácilmente la esterilidad, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden: (a) cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano descritos en el presente documento; (b) un tampón histidina a pH 5,0-6,0.

En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden: (a) cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano descritos en el presente documento; (b) un tampón histidina a pH 5,0-6,0; (c) un sacárido; y (d) un tensoactivo.

En algunos aspectos de cualquiera de las formulaciones, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano está presente a una concentración de entre aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml (por ejemplo, aproximadamente 15 mg/ml, 18 mg/ml, 20 mg/ml, 60 mg/ml y 75 mg/ml). En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano está presente a una concentración de aproximadamente 20 mg/ml. En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano está presente a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml. En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano está presente a una concentración de aproximadamente 60 mg/ml. En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano está presente a una concentración de aproximadamente 70 mg/ml.

En algunos aspectos de cualquiera de las formulaciones, el sacárido está presente a una concentración de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 360 mM (por ejemplo, de aproximadamente 100 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 240 mM, aproximadamente 320 mM a aproximadamente 360 mM). En algunos aspectos, el sacárido está presente a una concentración de aproximadamente 120 mM. En algunos aspectos, el sacárido está presente a una concentración de aproximadamente 240 mM. En algunos aspectos, el sacárido está presente a una concentración de aproximadamente 320 mM. En algunos aspectos, el sacárido es un disacárido. En algunos aspectos, el disacárido es trehalosa. En algunos aspectos, el disacárido es sacarosa.

En algunos aspectos de cualquiera de las formulaciones, el tampón histidina está a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM (por ejemplo, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 25 mM). En algunos aspectos, el tampón histidina está a una concentración de aproximadamente 10 mM. En algunos aspectos, el tampón histidina está a una concentración de aproximadamente 20 mM. En algunos aspectos, el tampón histidina está a una concentración de aproximadamente 30 mM. En algunos aspectos, el tampón histidina es acetato de histidina.

En algunos aspectos de cualquiera de las formulaciones, el tensioactivo es polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20 o polisorbato 40), poloxámero (por ejemplo, poloxámero 188); Triton; dodecilsulfato de sodio (SDS); laurilsulfato de sodio; u octilglucósido de sodio.

5 En algunos aspectos de cualquiera de las formulaciones, el tensioactivo es polisorbato. En algunos aspectos, el polisorbato está presente a una concentración de aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,1 %. En algunos aspectos, el polisorbato está presente a una concentración de aproximadamente un 0,005 %. En algunos aspectos, el polisorbato está presente a una concentración de aproximadamente un 0,02 %. En algunos aspectos, el polisorbato está presente a una concentración de aproximadamente un 0,04 %. En algunos aspectos, el polisorbato está presente a una concentración de aproximadamente un 0,06 %. En algunos aspectos, el polisorbato es polisorbato 20. En algunos aspectos, el polisorbato es polisorbato 80.

15 En algunos aspectos de cualquiera de las formulaciones, la formulación se diluye con un diluyente (por ejemplo, NaCl al 0,9 %). En algunos aspectos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano está presente a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml.

20 En particular, en el presente documento se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden (a) cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano descritos en el presente documento, (b) un polisorbato, en las que la concentración de polisorbato es de aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,1 %; y (c) un tampón histidina (por ejemplo, un tampón histidina a pH entre 5,0 y 6,0).

25 En algunos aspectos, la formulación farmacéutica comprende (a) cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano descritos en el presente documento (por ejemplo, a una concentración de entre aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml), (b) un polisorbato, en la que la concentración de polisorbato es de aproximadamente un 0,02 % a aproximadamente un 0,06 %; (c) un tampón histidina (por ejemplo, un tampón histidina a pH de 5,0 a 6,0); y un sacárido, en la que la concentración de sacárido es de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 320 mM. En algunos aspectos, el sacárido es sacarosa.

30 En algunos aspectos, la formulación farmacéutica comprende (a) cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano descritos en el presente documento a una concentración de entre aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, (b) un polisorbato, en la que la concentración de polisorbato es de aproximadamente un 0,02 % a aproximadamente un 0,06 %, en la que el polisorbato es polisorbato 20 o polisorbato 40; (c) un tampón acetato de histidina a pH de 5,0 a 6,0; y un sacárido (por ejemplo, sacarosa) a una concentración de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 320 mM.

35 En algunos aspectos, la formulación farmacéutica comprende (a) cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano descritos en el presente documento, (b) polisorbato 20, en la que la concentración de polisorbato es de aproximadamente un 0,02 % a aproximadamente un 0,06 %; (c) un tampón acetato de histidina (por ejemplo, un tampón acetato de histidina a pH de 5,0 a 6,0); y (d) sacarosa, en la que la concentración de sacarosa es de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 320 mM.

40 En algunos aspectos, la formulación farmacéutica comprende (a) cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano descritos en el presente documento, (b) polisorbato 40, en la que la concentración de polisorbato es de aproximadamente un 0,02 % a aproximadamente un 0,06 %; (c) un tampón acetato de histidina (por ejemplo, un tampón acetato de histidina a pH entre 5,0 y 6,0); y sacarosa, en la que la concentración de sacarosa es de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 320 mM.

45 En algunos aspectos, la formulación farmacéutica comprende (a) cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano descritos en el presente documento, (b) polisorbato 20, en la que la concentración de polisorbato es de aproximadamente un 0,02 %; (c) un tampón acetato de histidina a pH 6,0; y (d) sacarosa, en la que la concentración de sacarosa es de aproximadamente 320 mM.

50 En algunos aspectos, la formulación farmacéutica comprende (a) cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano descritos en el presente documento, (b) polisorbato 20, en la que la concentración de polisorbato es de aproximadamente un 0,02 %; (c) un tampón acetato de histidina a pH 5,5; y (d) sacarosa, en la que la concentración de sacarosa es de aproximadamente 240 mM.

55 En algunos aspectos, la formulación farmacéutica comprende (a) cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano descritos en el presente documento, (b) polisorbato 20, en la que la concentración de polisorbato es de aproximadamente un 0,04 %; (c) un tampón acetato de histidina a pH 6,0; y (d) sacarosa, en la que la concentración de sacarosa es de aproximadamente 120 mM.

60 En algunos aspectos, la formulación farmacéutica comprende (a) cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano descritos en el presente documento, (b) polisorbato 40, en la que la concentración de polisorbato es de aproximadamente un 0,04 %; (c) un tampón acetato de histidina a pH 5,0; y (d) sacarosa, en la que la concentración

de sacarosa es de aproximadamente 240 mM.

En algunos aspectos, la formulación farmacéutica comprende (a) cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano descritos en el presente documento, (b) polisorbato 40, en la que la concentración de polisorbato es de aproximadamente un 0,04 %; (c) un tampón acetato de histidina a pH 6,0; y (d) sacarosa, en la que la concentración de sacarosa es de aproximadamente 120 mM.

En algunos aspectos, la formulación farmacéutica es una formulación farmacéutica líquida. En algunos aspectos, la formulación farmacéutica es una formulación farmacéutica estable. En algunos aspectos, la formulación farmacéutica es una formulación farmacéutica líquida estable.

En algunos aspectos de cualquiera de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano de la formulación farmacéutica está presente a una concentración de entre aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml. En algunos aspectos, la concentración del anticuerpo agonista frente a OX40 humano está entre aproximadamente cualquiera de 10 mg/ml a 50 mg/ml, 10 mg/ml a 75 mg/ml, 25 mg/ml a 75 mg/ml, 50 mg/ml a 100 mg/ml, 50 mg/ml a 75 mg/ml y/o 75 mg/ml a 100 mg/ml. En algunos aspectos, la concentración del anticuerpo agonista frente a OX40 humano es mayor de aproximadamente cualquiera de 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml o 100 mg/ml.

La formulación farmacéutica comprende preferentemente un polisorbato. Se incluye, en general, el polisorbato en una cantidad que reduce la formación de agregados (tal como la que se produce tras la agitación o el transporte). Los ejemplos de polisorbato incluyen, pero no se limitan a, polisorbato 20 (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)), polisorbato 40 (monopalmitato de sorbitán polioxietileno (20)), polisorbato 60 (monoestearato de sorbitán polioxietileno (20)) y/o polisorbato 80 (monooleato de sorbitán polioxietileno (20)). En algunos aspectos, el polisorbato es polisorbato 20 (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). En algunos aspectos de cualquiera de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento, la concentración de polisorbato es suficiente para minimizar la agregación y/o mantener la estabilidad tras el almacenamiento a largo plazo y/o durante la administración (por ejemplo, después de la dilución en una bolsa i.v.). En algunos aspectos, la concentración de polisorbato es de aproximadamente un 0,005 % p/v, aproximadamente un 0,02 % p/v, aproximadamente un 0,04 % p/v y menos de aproximadamente un 0,1 % p/v. En algunos aspectos, la concentración de polisorbato es mayor de un 0,01 % p/v y de menos de aproximadamente un 0,1 % p/v. En algunos aspectos, la concentración de polisorbato es de aproximadamente cualquiera de un 0,005 % p/v, aproximadamente un 0,02 % p/v, 0,03 % p/v, 0,04 % p/v o 0,05 % p/v. En algunos aspectos, el polisorbato está presente a una concentración de aproximadamente un 0,04 % p/v. En algunos aspectos, el polisorbato está presente a una concentración de aproximadamente un 0,02 % p/v.

La formulación farmacéutica comprende preferentemente un sacárido. Los sacáridos incluyen monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos, alditoles, azúcares reductores, azúcares no reductores, etc. Otros ejemplos de sacáridos incluyen, pero no se limitan a, glucosa, sacarosa, trehalosa, lactosa, fructosa, maltosa, dextrano, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol, manitol, melibiosa, melecitosa, rafinosa, manotriosa, estaquiosa, maltosa, lactulosa, maltulosa, glucitol, maltitol, lactitol, isomaltulosa, etc. En algunos aspectos, el sacárido es un disacárido. En algunos aspectos, el sacárido es un disacárido no reductor. En algunos aspectos, el sacárido es trehalosa.

Se incluye, en general, el sacárido en una cantidad que reduce la formación de agregados. En algunos aspectos de cualquiera de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento, el sacárido está presente a una concentración de entre aproximadamente cualquiera de 50 mM a 250 mM, 75 mM a 200 mM, 75 mM a 150 mM, 100 mM a 150 mM, o 110 mM a 130 mM, o 100mM a 320 mM, o 240 mM a 320 mM, o 240 mM a 400 mM. En algunos aspectos, el sacárido está presente a una concentración mayor de aproximadamente cualquiera de 50 mM, 75 mM, 100 mM, 110 mM o 115 mM. En algunos aspectos, el sacárido está presente a una concentración de aproximadamente cualquiera de 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM o 140 mM. En algunos aspectos, el sacárido está presente a una concentración de aproximadamente 120 mM. En algunos aspectos de cualquiera de las formulaciones, el sacárido está presente a una concentración de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 360 mM (por ejemplo, de aproximadamente 100 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 240 mM, aproximadamente 320 mM a aproximadamente 360 mM). En algunos aspectos, el sacárido está presente a una concentración de aproximadamente 240 mM. En algunos aspectos, el sacárido está presente a una concentración de aproximadamente 320 mM.

La formulación farmacéutica comprende preferentemente un tampón histidina. Los ejemplos de tampones histidina incluyen, pero no se limitan a, cloruro de histidina, succinato de histidina, acetato de histidina, fosfato de histidina, sulfato de histidina. En algunos aspectos, el tampón histidina es acetato de histidina. En algunos aspectos de cualquiera de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento, la concentración de tampón histidina está entre aproximadamente cualquiera de 1 mM a 50 mM, 1 mM a 35 mM, 1 mM a 25 mM, 1 mM a 20 mM, 7,5 mM a 12,5 mM, o 5 mM a 15 mM, 20 mM a 30 mM, 25 mM a 35 mM. En algunos aspectos, la concentración de tampón histidina es aproximadamente cualquiera de 5 mM, 7,5 mM, 10 mM, 12,5 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM o 40 mM. En algunos aspectos, la concentración de tampón histidina es de aproximadamente 10 mM. En algunos aspectos, la concentración de tampón histidina es de aproximadamente 20 mM. En algunos aspectos, la

concentración de tampón histidina es de aproximadamente 30 mM. En algunos aspectos, la concentración de tampón histidina es de aproximadamente 40 mM. En algunos aspectos de cualquiera de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento, el tampón histidina está a un pH de entre pH 5,0 y 6,0, por ejemplo, aproximadamente cualquiera de pH 5,0, pH 5,1, pH 5,2, pH 5,3, pH 5,4, pH 5,5, pH 5,6, pH 5,7, pH 5,8, pH 5,9 o pH 6,0. En algunos aspectos, el pH está entre pH 4,9 a pH 6,3.

La formulación farmacéutica en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo, según sea necesario, para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se vean afectadas de forma adversa entre sí. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que sean eficaces para el propósito pretendido.

Además, en el presente documento se proporcionan viales y procedimientos de llenado de un vial que comprende una formulación farmacéutica descrita en el presente documento. En algunos aspectos, se proporciona la formulación farmacéutica dentro de un vial con un tapón perforable por una jeringuilla, preferentemente en forma acuosa. El vial se almacena de forma deseable a aproximadamente 2-8 °C, así como hasta 30 °C durante 24 horas hasta que se administra a un sujeto que lo necesite. El vial puede ser, por ejemplo, un vial de 15 cm<sup>3</sup> (por ejemplo, para una dosis de 200 mg).

La formulación farmacéutica para su administración es preferentemente una formulación líquida (no liofilizada) y no se ha sometido a liofilización previa. Aunque la formulación farmacéutica puede estar liofilizada, preferentemente no lo está. En algunos aspectos de cualquiera de las formulaciones farmacéuticas, la formulación farmacéutica es una formulación farmacéutica liofilizada. En algunos aspectos, la formulación farmacéutica es una formulación líquida. En algunos aspectos, la formulación farmacéutica no contiene ninguna cantidad tónica de una sal tal como cloruro de sodio. En algunos aspectos de cualquiera de las formulaciones farmacéuticas, se diluye la formulación farmacéutica.

## **G. Procedimientos terapéuticos y composiciones**

Se puede usar cualquiera de los anticuerpos anti-OX40 humano proporcionados en el presente documento en procedimientos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista anti-OX40 humano para su uso como un medicamento. En otros aspectos, se proporciona un anticuerpo agonista anti-OX40 humano para su uso en el tratamiento del cáncer. En determinados aspectos, se proporciona un anticuerpo agonista anti-OX40 humano para su uso en un procedimiento de tratamiento. En determinados aspectos, la invención proporciona un anticuerpo agonista anti-OX40 humano para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene cáncer que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-OX40 humano agonista. En un aspecto de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

En un aspecto, se divulga un anticuerpo agonista anti-OX40 humano para su uso en la potenciación de la función inmunitaria (por ejemplo, regulando por incremento las respuestas inmunitarias mediadas por células) en un individuo que tiene cáncer que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-OX40 humano agonista. En un aspecto, se divulga un anticuerpo agonista anti-OX40 humano para su uso en la potenciación de la función de los linfocitos T en un individuo que tiene cáncer que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-OX40 humano agonista. En un aspecto, se divulga un anticuerpo agonista anti-OX40 humano para su uso en la disminución de las células que expresan OX40 humano (por ejemplo, linfocitos T que expresan OX40, por ejemplo, Treg que expresan OX40) que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-OX40 humano agonista. En algunos aspectos, la disminución es por ADCC. En algunos aspectos, la disminución es por fagocitosis. Se divulga un anticuerpo agonista anti-OX40 humano para tratar a un individuo que tiene inmunidad tumoral.

En otros aspectos, se divulga un anticuerpo agonista anti-OX40 humano para su uso en el tratamiento de una infección (por ejemplo, con una bacteria o virus u otro patógeno). En determinados aspectos, se divulga un anticuerpo agonista anti-OX40 humano para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene una infección que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-OX40 humano agonista. En algunos aspectos, la infección es con un virus y/o una bacteria. En algunos aspectos, la infección es con un patógeno.

En otro aspecto, se divulga el uso de un anticuerpo anti-OX40 en la fabricación o preparación de un medicamento. En un aspecto, el medicamento es para el tratamiento del cáncer. En otro aspecto, el medicamento es para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un individuo que tiene cáncer una cantidad eficaz del medicamento. En un aspecto de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

En un aspecto, el medicamento es para su uso en la potenciación de la función inmunitaria (por ejemplo, regulando por incremento las respuestas inmunitarias mediadas por células) en un individuo que tiene cáncer que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento. En un aspecto, el medicamento es para su uso en la

potenciación de la función de los linfocitos T en un individuo que tiene cáncer que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento. En algunos aspectos, el trastorno por linfocitos T disfuncionales es cáncer. En un aspecto, el medicamento es para su uso en la disminución de las células que expresan OX40 humano (por ejemplo, células de alta expresión de OX40, por ejemplo, linfocitos T que expresan OX40) que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento. En algunos aspectos, la disminución es por ADCC. En algunos aspectos, la disminución es por fagocitosis. En un aspecto, el medicamento es para tratar a un individuo que tiene inmunidad tumoral.

En otros aspectos, el medicamento es para su uso en el tratamiento de una infección (por ejemplo, con una bacteria o virus u otro patógeno). En determinados aspectos, el medicamento es para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene una infección que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento. En algunos aspectos, la infección es con virus y/o bacterias. En algunos aspectos, la infección es con un patógeno.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar un cáncer. En un aspecto, el procedimiento comprende administrar a un individuo que tiene dicho cáncer una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-OX40. En un aspecto de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, como se describe a continuación. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores puede ser un ser humano.

En un aspecto, se divulga un procedimiento para potenciar la función inmunitaria (por ejemplo, regulando por incremento las respuestas inmunitarias mediadas por células) en un individuo que tiene cáncer que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-OX40 humano agonista. En un aspecto, se divulga un procedimiento para potenciar la función de los linfocitos T en un individuo que tiene cáncer que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-OX40 humano agonista. En un aspecto, se divulga un procedimiento para disminuir las células que expresan OX40 humano (por ejemplo, células que expresan un alto nivel de OX40, por ejemplo, linfocitos T que expresan OX40) que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-OX40 humano agonista. En algunos aspectos, la disminución es por ADCC. En algunos aspectos, la disminución es por fagocitosis.

En algunos aspectos, los ejemplos de cáncer incluyen además, pero no se limitan a, linfoma de linfocitos B (incluyendo linfoma no hodgkiniano (LNH) de grado bajo/folicular; LNH linfocítico pequeño (LP); LNH de grado intermedio/folicular; LNH difuso de grado intermedio; LNH inmunoblástico de grado alto; LNH linfoblástico de grado alto; LNH de células no hendidas pequeñas de grado alto; LNH con gran masa tumoral; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con el sida y macroglobulinemia de Waldenström); leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfoblástica aguda (LLA); tricoleucemia; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante (PTLD), así como proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), trastornos proliferativos de linfocitos B y síndrome de Meigs. Los ejemplos más específicos incluyen, pero no se limitan a, LNH recidivante o resistente al tratamiento, LNH de primera línea de grado bajo, LNH en estadio III/IV, LNH resistente a quimioterapia, leucemia y/o linfoma linfoblástico de linfocitos B precursores, linfoma linfocítico pequeño, leucemia linfocítica crónica y/o leucemia prolinfocítica de linfocitos B y/o linfoma linfocítico pequeño, linfoma prolinfocítico de linfocitos B, inmunocitoma y/o linfoma linfoplasmocítico, linfoma linfoplasmocítico, linfoma de linfocitos B de la zona marginal, linfoma esplénico de la zona marginal, linfoma extraganglionar de la zona marginal de TLAM, linfoma ganglionar de la zona marginal, tricoleucemia, plasmocitoma y/o mieloma de células plasmáticas, linfoma de grado bajo/folicular, LNH de grado intermedio/folicular, linfoma de células del manto, linfoma centrofolicular (folicular), LNH difuso de grado intermedio, linfoma difuso de linfocitos B grandes, LNH de gran malignidad (incluyendo LNH de gran malignidad de primera línea y LNH de gran malignidad recidivante), LNH recidivante después del o resistente al trasplante de células madre autólogas, linfoma de linfocitos B grandes mediastínico primario, linfoma de efusión primario, LNH inmunoblástico de grado alto, LNH linfoblástico de grado alto, LNH de células no hendidas pequeñas de grado alto, LNH con gran masa tumoral, linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica de los linfocitos grandes granulares precursores (periféricos), micosis fungoide y/o síndrome de Sezary, linfomas de la piel (cutáneos), linfoma anaplásico de células grandes, linfoma angiocéntrico.

En algunos aspectos, los ejemplos de cáncer incluyen además, pero no se limitan a, trastornos proliferativos de linfocitos B, que incluyen además, pero no se limitan a, linfomas (por ejemplo, linfomas no hodgkinianos (LNH) de linfocitos B) y leucemias linfocíticas. Dichos linfomas y leucemias linfocíticas incluyen, por ejemplo, a) linfomas foliculares, b) linfomas de células no hendidas pequeñas/linfoma de Burkitt (incluyendo linfoma de Burkitt endémico, linfoma de Burkitt esporádico y linfoma distinto de linfoma de Burkitt), c) linfomas de la zona marginal (incluyendo linfoma de linfocitos B extraganglionar de la zona marginal (linfomas de tejidos linfáticos asociados a mucosas, TLAM), linfoma de linfocitos B ganglionar de la zona marginal y linfoma esplénico de la zona marginal), d) linfoma de células del manto (LCM), e) linfoma de células grandes (incluyendo linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma difuso de células mixtas, linfoma inmunoblástico, linfoma de linfocitos B mediastínico primario, linfoma angiocéntrico-linfoma pulmonar de linfocitos B), f) tricoleucemia, g) linfoma linfocítico, macroglobulinemia de Waldenström, h) leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC)/linfoma linfocítico pequeño (LLP), leucemia prolinfocítica de los linfocitos B, i) neoplasias de células plasmáticas, mieloma de células plasmáticas, mieloma múltiple, plasmocitoma y/o j) enfermedad de Hodgkin.

5 En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos, el cáncer es un trastorno proliferativo de linfocitos B. En algunos aspectos, el trastorno proliferativo de linfocitos B es linfoma, linfoma no hodgkiniano (LNH), LNH de gran malignidad, LNH recidivante de gran malignidad, LNH recidivante de escasa malignidad, LNH resistente al tratamiento, LNH resistente al tratamiento de escasa malignidad, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, tricoleucemia (TL), leucemia linfocítica aguda (LLA) o linfoma de células del manto. En algunos aspectos, el trastorno proliferativo de linfocitos B es LNH, tal como LNH de escasa malignidad y/o LNH de gran malignidad. En algunos aspectos, el trastorno proliferativo de linfocitos B es un linfoma de escasa malignidad folicular o linfoma difuso de linfocitos B grandes.

10 En otro aspecto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-OX40 proporcionados en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos anteriores. En un aspecto, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-OX40 proporcionados en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-OX40 proporcionados en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

20 En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos de la invención, los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano inhiben la inmunidad tumoral inhibiendo la función de los Treg (por ejemplo, inhibiendo la función supresora de los Treg), destruyendo células que expresan OX40 (por ejemplo, células que expresan altos niveles de OX40), incrementando la función de los linfocitos T efectores y/o incrementando la función de los linfocitos T de memoria. En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos de la invención, los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano tratan el cáncer inhibiendo la función de los Treg (por ejemplo, inhibiendo la función supresora de los Treg), destruyendo células que expresan OX40 (por ejemplo, células que expresan altos niveles de OX40), incrementando la función de los linfocitos T efectores y/o incrementando la función de los linfocitos T de memoria. En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos de la invención, los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano potencian la función inmunitaria inhibiendo la función de los Treg (por ejemplo, inhibiendo la función supresora de los Treg), destruyendo células que expresan OX40 (por ejemplo, células que expresan altos niveles de OX40), incrementando la función de los linfocitos T efectores y/o incrementando la función de los linfocitos T de memoria. En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos de la invención, los anticuerpos agonistas anti-OX40 humano potencian la función de los linfocitos T inhibiendo la función de los Treg (por ejemplo, inhibiendo la función supresora de los Treg), destruyendo células que expresan OX40 (por ejemplo, células que expresan altos niveles de OX40), incrementando la función de los linfocitos T efectores y/o incrementando la función de los linfocitos T de memoria.

35 En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano es un anticuerpo agonista antihumano de disminución. En algunos aspectos, el tratamiento con el anticuerpo agonista anti-OX40 humano da como resultado la disminución de las células (por ejemplo, la disminución de las células que expresan OX40, por ejemplo, la disminución de las células que expresan altos niveles de OX40). En algunos aspectos, la disminución es por ADCC. En algunos aspectos, la disminución es por fagocitosis.

40 En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano inhibe la función de los Treg, por ejemplo, inhibiendo la supresión por Treg de la función de los linfocitos T efectores y/o de memoria (en algunos aspectos, la proliferación de linfocitos T efectores y/o linfocitos T de memoria y/o segregación de citocinas), con respecto a la función de los Treg antes de la administración del anticuerpo agonista frente a OX40. En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano incrementa la proliferación de linfocitos T efectores, con respecto a la proliferación de linfocitos T efectores antes de la administración del anticuerpo agonista frente a OX40. En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano incrementa la proliferación de linfocitos T de memoria, con respecto a la proliferación de linfocitos T de memoria antes de la administración del anticuerpo agonista frente a OX40. En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano incrementa la producción de citocinas por los linfocitos T efectores (por ejemplo, la producción de interferón gamma), con respecto a la producción de citocinas por los linfocitos T efectores antes de la administración del anticuerpo agonista frente a OX40. En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano incrementa la producción de citocinas por los linfocitos T de memoria (por ejemplo, la producción de interferón gamma), con respecto a la producción de citocinas por los linfocitos T de memoria antes de la administración del anticuerpo agonista frente a OX40. En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano incrementa la proliferación de linfocitos T efectores CD4+ y/o proliferación de linfocitos T efectores CD8+ con respecto a la proliferación de linfocitos T efectores CD4+ y/o proliferación de linfocitos T efectores CD8+ antes de la administración del anticuerpo agonista frente a OX40. En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano incrementa la proliferación de linfocitos T de memoria (por ejemplo, la proliferación de linfocitos T de memoria CD4+), con respecto a la proliferación de linfocitos T de memoria antes de la administración del anticuerpo agonista frente a OX40. En algunos aspectos, los linfocitos T efectores CD4+ en el individuo tienen proliferación potenciada, segregación de citocinas y/o actividad citolítica con respecto a la proliferación, segregación de citocinas y/o actividad citolítica antes de la administración del anticuerpo agonista anti-OX40 humano.

65 En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos de la invención, el número de linfocitos T efectores CD4+

- es elevado con respecto a antes de la administración del anticuerpo agonista anti-OX40 humano. En algunos aspectos, la segregación de citocinas por los linfocitos T efectores CD4+ es elevada con respecto a antes de la administración del anticuerpo agonista anti-OX40 humano. En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos, los linfocitos T efectores CD8+ en el individuo tienen proliferación potenciada, segregación de citocinas y/o actividad citolítica con respecto a antes de la administración del anticuerpo agonista anti-OX40 humano. En algunos aspectos, el número de linfocitos T efectores CD8+ es elevado con respecto a antes de la administración del anticuerpo agonista anti-OX40 humano. En algunos aspectos, la segregación de citocinas por los linfocitos T efectores CD8+ es elevada con respecto a antes de la administración del anticuerpo agonista anti-OX40 humano.
- 5
- 10 En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos de la invención, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano se une a células efectoras humanas, por ejemplo, se une a FcγR expresado por células efectoras humanas. En algunos aspectos, la célula efectora humana realiza la función efectora ADCC. En algunos aspectos, la célula efectora humana realiza la función efectora fagocitosis.
- 15 En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos de la invención, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende un polipéptido con Fc de IgG1 variante que comprende una mutación que elimina la unión a las células efectoras humanas (por ejemplo, una mutación DANA o N297G) tiene actividad reducida (por ejemplo, la función de los linfocitos T efectores CD4+, por ejemplo, la proliferación), con respecto al anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende la porción Fc de IgG1 de secuencia natural. En algún aspecto, el anticuerpo agonista anti-OX40 humano que comprende un polipéptido con Fc de IgG1 variante que comprende una mutación que elimina la unión a células efectoras humanas (por ejemplo, una mutación DANA o N297G) no posee actividad sustancial (por ejemplo, la función de los linfocitos T efectores CD4+, por ejemplo, la proliferación).
- 20
- 25 En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos de la invención, se requiere la reticulación del anticuerpo para la función del anticuerpo agonista anti-OX40 humano. En algunos aspectos, la función es la estimulación de la proliferación de linfocitos T efectores CD4+. En algunos aspectos, se determina la reticulación del anticuerpo proporcionando el anticuerpo agonista anti-OX40 humano adherido sobre una superficie sólida (por ejemplo, una placa de cultivo celular). En algunos aspectos, se determina la reticulación del anticuerpo introduciendo una mutación en la porción Fc de IgG1 del anticuerpo (por ejemplo, una mutación DANA o N297S) y la función de prueba del anticuerpo mutante.
- 30
- 35 En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos, los linfocitos T de memoria en el individuo tienen proliferación potenciada y/o segregación de citocinas con respecto a antes de la administración del anticuerpo agonista anti-OX40 humano. En algunos aspectos, el número de linfocitos T de memoria es elevado con respecto a antes de la administración del anticuerpo agonista anti-OX40 humano. En algunos aspectos, la segregación (nivel) de citocinas por los linfocitos T de memoria es elevada con respecto a antes de la administración del anticuerpo agonista anti-OX40 humano. En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos, el Treg en el individuo tiene inhibición disminuida de la función de los linfocitos T efectores (por ejemplo, la proliferación y/o segregación de citocinas) con respecto a antes de la administración del anticuerpo agonista anti-OX40 humano. En algunos aspectos, el número de linfocitos T efectores es elevado con respecto a antes de la administración del anticuerpo agonista anti-OX40 humano. En algunos aspectos, la segregación (nivel) de citocinas por los linfocitos T efectores es elevada con respecto a antes de la administración del anticuerpo agonista anti-OX40 humano.
- 40
- 45 En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos de la invención, el número de linfocitos T efectores CD4+ intratumorales (infiltrantes) (por ejemplo, el número total de linfocitos T efectores CD4+, o, por ejemplo, el porcentaje de células CD4+ en las células CD45+) es elevado con respecto a antes de la administración del anticuerpo agonista anti-OX40 humano. En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos de la invención, el número de linfocitos T efectores CD4+ intratumorales (infiltrantes) que expresan el interferón gamma (por ejemplo, las células CD4+ que expresan el interferón gamma totales, o, por ejemplo, el porcentaje de células CD4+ que expresan el interferón gamma en las células CD4+ totales) es elevado con respecto a antes de la administración del anticuerpo agonista anti-OX40 humano.
- 50
- 55 En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos de la invención, el número de linfocitos T efectores CD8+ intratumorales (infiltrantes) (por ejemplo, el número total de linfocitos T efectores CD8+, o, por ejemplo, el porcentaje de CD8+ en las células CD45+) es elevado con respecto a antes de la administración del anticuerpo agonista anti-OX40 humano. En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos de la invención, el número de linfocitos T efectores CD8+ intratumorales (infiltrantes) que expresan el interferón gamma (por ejemplo, el porcentaje de células CD8+ que expresan el interferón gamma en las células CD8+ totales) se incrementa con respecto a antes de la administración del anticuerpo agonista anti-OX40 humano.
- 60
- 65 En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos de la invención, el número de Treg intratumoral (infiltrante) (por ejemplo, el número total de Treg o, por ejemplo, el porcentaje de células Fox3p+ en células CD4+) se reduce con respecto a antes de la administración del anticuerpo agonista anti-OX40 humano.
- En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos de la invención, la administración del anticuerpo agonista anti-OX40 humano está en combinación con la administración de un antígeno tumoral. En algunos aspectos, el



antígeno tumoral comprende una proteína. En algunos aspectos, el antígeno tumoral comprende un ácido nucleico. En algunos aspectos, el antígeno tumoral es una célula tumoral.

5 En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos de la invención, el cáncer presenta células efectoras humanas (por ejemplo, se infiltra por células efectoras humanas). Los procedimientos para detectar células efectoras humanas son bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, por IHQ. En algunos aspectos, el cáncer presenta altos niveles de células efectoras humanas. En algunos aspectos, las células efectoras humanas son una o más de linfocitos NK, macrófagos, monocitos. En algunos aspectos, el cáncer es cualquier cáncer descrito en el presente documento. En algunos aspectos, el cáncer es carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), glioblastoma, neuroblastoma, melanoma, carcinoma de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), cáncer gástrico, 10 cáncer colorrectal (CCR) o carcinoma hepatocelular.

15 En algunos aspectos de cualquiera de los procedimientos de la invención, el cáncer presenta células que expresan FcR (por ejemplo, se infiltra por células que expresan FcR). Los procedimientos para detectar FcR son bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, por IHQ. En algunos aspectos, el cáncer presenta altos niveles de células que expresan FcR. En algunos aspectos, FcR es FcγR. En algunos aspectos, FcR es un FcγR activador. En algunos aspectos, el cáncer es carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), glioblastoma, neuroblastoma, melanoma, carcinoma de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CCR) o carcinoma hepatocelular.

20 Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores es preferentemente un ser humano.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar solos o bien en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, se puede coadministrar un anticuerpo de la invención con al menos un agente terapéutico adicional.

25 Dichas politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención se puede producir antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente o agentes terapéutico(s) adicional(es). En un modo de realización, la administración del anticuerpo anti-OX40 y la administración de un agente terapéutico adicional se produce en aproximadamente un mes, 30 o en aproximadamente una, dos o tres semanas, o en aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí. Los anticuerpos de la invención también se pueden usar en combinación con radioterapia.

35 En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un agente de quimioterapia o quimioterápico. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un agente de radioterapia o radioterápico. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un tratamiento dirigido o un agente terapéutico dirigido. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un agente de inmunoterapia o inmunoterápico, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal.

40 En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de PARP (por ejemplo, olaparab, rucaparib, niraparib, cediranib, BMN673, veliparib), trabectedina, nab-paclitaxel (paclitaxel unido a albúmina, ABRIXANE), trebananib, pazopanib, cediranib, palbociclib, everólimus, fluoropirimidina (por ejemplo, FOLFOX, FOLFIRI), IFL, regorafenib, Reolysin, Alimta, Zykadia, Sutent, Torisel (temsirólimus), Inlyta (axitinib, Pfizer), Afinitor (everólimus, Novartis), Nexavar (sorafenib, Onyx / Bayer), Votrient, pazopanib, axitinib, IMA-901, AGS-003, cabozantinib, vinflunina, inhibidor de Hsp90 (por ejemplo, apatorsina), Ad-GM-CSF (CT-0070), temazolomida, IL-2, IFNα, vinblastina, Thalomid, dacarbacina, ciclofosfamida, lenalidomida, azacitidina, lenalidomida, bortezomid (VELCADE), amrubicina, carfilzomib, pralatrexato y/o enzastaurina.

50 En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un antagonista de unión al eje de PD-1. Un antagonista de unión al eje de PD-1 incluye, pero no se limita a, un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de unión a PD-L2. Los nombres alternativos para "PD-1" incluyen CD279 y SLEB2. Los nombres alternativos para "PD-L1" incluyen B7-H1, B7-4, CD274 y B7-H. Los nombres alternativos para "PD-L2" incluyen B7-DC, Btdc y CD273. En algunos aspectos, PD-1, PD-L1 y PD-L2 son PD-1, PD-L1 y PD-L2 humanos. En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a sus compañeros de unión de ligando. En un aspecto específico, los compañeros de unión de ligando a PD-1 son PD-L1 y/o PD-L2. En otro modo de realización, un antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, los compañeros de unión a PD-L1 son PD-1 y/o B7-1. En otro modo de realización, el antagonista de unión a PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, un compañero de unión a PD-L2 es PD-1. El antagonista puede ser un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno del mismo, una inmunoadhesina, una proteína de fusión u oligopéptido. En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico). En algunos aspectos, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en MDX-1106 (nivolumab, OPDIVO), Merck 3475 (MK-3475, pembrolizumab, KEYTRUDA) y CT-011 (Pidilizumab). En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-1 es una inmunoadhesina (por ejemplo, una inmunoadhesina que comprende una porción extracelular o de unión a PD-1 de 65

PD-L1 o PD-L2 fusionada a una región constante (por ejemplo, una región Fc de una secuencia de inmunoglobulina)). En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-1 es AMP-224. En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En algunos aspectos, el antagonista de unión anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI4736 y MDX-1105. MDX-1105, también conocido como BMS-936559, es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en el documento WO2007/005874. El anticuerpo YW243.55.S70 (secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera mostradas en las SEQ ID NO: 20 y 21, respectivamente) es un anti-PD-L1 descrito en el documento WO 2010/077634 A1. MDX-1106, también conocido como MDX-1106-04, ONO-4538, BMS-936558 o nivolumab, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO2006/121168. Merck 3475, también conocido como MK-3475, SCH-900475 o pembrolizumab, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO2009/114335. CT-011, también conocido como hBAT, hBAT-1 o pidilizumab, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO2009/101611. AMP-224, también conocido como B7-DCIg, es un receptor soluble de fusión PD-L2-Fc descrito en los documentos WO2010/027827 y WO2011/066342. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-PD-1 es MDX-1106. Los nombres alternativos para "MDX-1106" incluyen MDX-1 106-04, ONO-4538, BMS-936558 o nivolumab. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab (número de registro de CAS: 946414-94-4).

En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un agonista dirigido frente a una molécula coestimuladora activadora. En algunos aspectos, una molécula coestimuladora activadora puede incluir CD40, CD226, CD28, GITR, CD137, CD27, HVEM o CD127. En algunos aspectos, el agonista dirigido frente a una molécula coestimuladora activadora es un anticuerpo agonista que se une a CD40, CD226, CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, HVEM o CD127. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un antagonista dirigido frente a una molécula coestimuladora inhibidora. En algunos aspectos, una molécula coestimuladora inhibidora puede incluir CTLA-4 (también conocido como CD152), PD-1, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3, B7-H3, B7-H4,IDO, TIGIT, MICA/B o arginasa. En algunos aspectos, el antagonista dirigido frente a una molécula coestimuladora inhibidora es un anticuerpo antagonista que se une a CTLA-4, PD-1, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3 (por ejemplo, proteína de fusión LAG-3-IgG (IMP321)), B7-H3, B7-H4, IDO, TIGIT, MICA/B o arginasa.

En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un antagonista dirigido frente a CTLA-4 (también conocido como CD152), por ejemplo, un anticuerpo bloqueante. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con ipilimumab (también conocido como MDX-010, MDX-101 o Yervoy®). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con tremelimumab (también conocido como ticilimumab o CP-675.206). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un antagonista dirigido frente a B7-H3 (también conocido como CD276), por ejemplo, un anticuerpo bloqueante. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con MGA271. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un antagonista dirigido frente a un TGF beta, por ejemplo, metelimumab (también conocido como CAT-192), fresolimumab (también conocido como GC1008) o LY2157299.

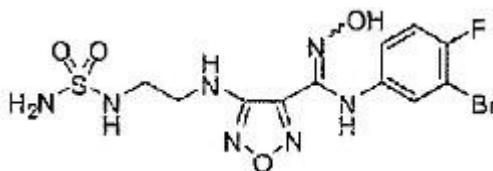
En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un tratamiento que comprende la transferencia adoptiva de un linfocito T (por ejemplo, un linfocito T citotóxico o CTL) que expresa un receptor antigénico quimérico (RAQ). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con UCART19. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con WT128z. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con KTE-C19 (Kite). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con CTL019 (Novartis). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un tratamiento que comprende la transferencia adoptiva de un linfocito T que comprende un receptor de TGF beta dominante negativo, por ejemplo, un receptor de tipo II de TGF beta dominante negativo. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un tratamiento que comprende un protocolo HERCREEM (véase, por ejemplo, ClinicalTrials.gov Identifier NCT00889954).

En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un antagonista dirigido frente a CD19. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con MOR00208. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un antagonista dirigido frente a CD38. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con daratumumab.

En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un agonista dirigido frente a CD137 (también conocido como TNFRSF9, 4-1BB o ILA), por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con urelumab (también conocido como BMS-663513). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un agonista dirigido frente a CD40, por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con CP-870893. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un agonista dirigido frente a OX40 (también conocido como CD134), por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un anticuerpo anti-OX40 diferente (por ejemplo, AgonOX). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un agonista dirigido frente a CD27, por ejemplo, un

anticuerpo activador. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con CDX-1127. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un antagonista dirigido frente a indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO). En algunos aspectos, el antagonista de IDO es 1-metil-D-triptófano (también conocido como 1-D-MT).

En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un agonista dirigido frente a CD137 (también conocido como TNFRSF9, 4-1BB o ILA), por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con urelumab (también conocido como BMS-663513). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un agonista dirigido frente a CD40, por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con CP-870893 o RO7009789. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un agonista dirigido frente a OX40 (también conocido como CD134), por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un agonista dirigido frente a CD27, por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con CDX-1127 (también conocido como varilumab). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un antagonista dirigido frente a indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO). En algunos aspectos, el antagonista de IDO es 1-metil-D-triptófano (también conocido como 1-D-MT). En algunos aspectos, el antagonista de IDO es un antagonista de IDO mostrado en el documento WO2010/005958 (cuyo contenido se incorpora expresamente por registro en el presente documento). En algunos aspectos, el antagonista de IDO es 4-((2-[(aminosulfonil)amino]etil)amino)-N-(3-bromo-4-fluorofenil)-N'-hidroxi-1,2,5-oxadiazol-3-carboximidamida (por ejemplo, como se describe en el ejemplo 23 del documento WO2010/005958). En algunos aspectos, el antagonista de IDO es



En algunos aspectos, el antagonista de IDO es INCB24360. En algunos aspectos, el antagonista de IDO es Indoximod (el isómero D de 1-metil-triptófano). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un conjugado anticuerpo-fármaco. En algunos aspectos, el conjugado anticuerpo-fármaco comprende mertansina o monometil auristatina E (MMAE). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un conjugado anticuerpo anti-NaPi2b-MMAE (también conocido como DNIB0600A, RG7599 o lifastuzumab vedotina). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con trastuzumab emtansina (también conocida como T-DM1, ado-trastuzumab emtansina o KADCYLA®, Genentech). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un conjugado anticuerpo anti-MUC16-MMAE, DMUC5754A. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un conjugado anticuerpo anti-MUC16-MMAE, DMUC4064A. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido al receptor de endotelina B (EDNBR), por ejemplo, un anticuerpo dirigido frente a EDNBR conjugado con MMAE. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido al complejo 6 de antígeno linfocítico, locus E (Ly6E), por ejemplo, un anticuerpo dirigido frente a Ly6E conjugado con MMAE, (también conocido como DLYE5953A). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con polatuzumab vedotina. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD30. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con ADCETRIS (también conocido como brentuximab vedotina). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con polatuzumab vedotina.

En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de la angiogénesis. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un anticuerpo dirigido frente a un VEGF, por ejemplo, VEGF-A. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con bevacizumab (también conocido como AVASTIN®, Genentech). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un anticuerpo dirigido frente a angiopoyetina 2 (también conocida como Ang2). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con MED13617. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un anticuerpo dirigido frente a VEGFR2. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con ramucirumab. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con una proteína de fusión de receptores de VEGF. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con aflibercept. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con ziv-aflibercept (también conocido como VEGF Trap o Zaltrap®). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un anticuerpo biespecifico dirigido frente a VEGF y Ang2. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo

agonista anti-OX40 humano junto con RG7221 (también conocido como vanucizumab). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de la angiogénesis y junto con un antagonista de unión al eje de PD-1 (por ejemplo, un antagonista de unión a PD-1, tal como un anticuerpo anti-PD-1, un antagonista de unión a PD-L1, tal como un anticuerpo anti-PD-L1, y un antagonista de unión a PD-L2, tal como un anticuerpo anti-PD-L2). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con bevacizumab y un antagonista de unión al eje de PD-1 (por ejemplo, un antagonista de unión a PD-1, tal como un anticuerpo anti-PD-1, un antagonista de unión a PD-L1, tal como un anticuerpo anti-PD-L1, y un antagonista de unión a PD-L2, tal como un anticuerpo anti-PD-L2). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con bevacizumab y MDX-1106 (nivolumab, OPDIVO). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con bevacizumab y Merck 3475 (MK-3475, pembrolizumab, KEYTRUDA). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con bevacizumab y CT-011 (Pidilizumab). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con bevacizumab e YW243.55.S70. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con bevacizumab y MPDL3280A. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con bevacizumab y MEDI4736. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con bevacizumab y MDX-1105.

En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un antineoplásico. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un agente dirigido a CSF-1R (también conocido como M-CSFR o CD115). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con el anticuerpo anti-CSF-1R (también conocido como IMC-CS4 o LY3022855). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con anticuerpo anti-CSF-1R, RG7155 (también conocido como RO5509554 o emactuzumab). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un interferón, por ejemplo, interferón alfa o interferón gamma. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con Roferon-A (también conocido como interferón alfa-2a recombinante). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con GM-CSF (también conocido como factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos humano recombinante, rhu GM-CSF, sargramostim o Leukine®). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con IL-2 (también conocida como aldesleucina o Proleukin®). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con IL-12. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con IL27. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con IL-15. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con ALT-803. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un anticuerpo dirigido a CD20. En algunos aspectos, el anticuerpo dirigido a CD20 es obinutuzumab (también conocido como GA101 o Gazyva®) o rituximab. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un anticuerpo dirigido a GITR. En algunos aspectos, el anticuerpo dirigido a GITR es TRX518. En algunos aspectos, el anticuerpo dirigido a GITR es MK04166 (Merck).

En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de tirosina cinasa de Bruton (BTK). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con ibrutinib. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) y/o isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con AG-120 (Agiros).

En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con obinutuzumab y un antagonista de unión al eje de PD-1 (por ejemplo, un antagonista de unión a PD-1, tal como un anticuerpo anti-PD-1, un antagonista de unión a PD-L1, tal como un anticuerpo anti-PD-L1, y un antagonista de unión a PD-L2, tal como un anticuerpo anti-PD-L2).

En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con una vacuna contra el cáncer. En algunos aspectos, la vacuna contra el cáncer es una vacuna contra el cáncer peptídica, que, en algunos aspectos, es una vacuna peptídica personalizada. En algunos aspectos, la vacuna contra el cáncer peptídica es un péptido largo multivalente, un péptido múltiple, una mezcla de péptidos, un péptido híbrido o una vacuna de células dendríticas pulsadas con péptidos (véase, por ejemplo, Yamada *et al.*, Cancer Sci, 104:14-21, 2013). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un adyuvante. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un tratamiento que comprende un agonista de TLR, por ejemplo, poli-ICLC (también conocido como Hiltonol®), LPS, MPL u ODN con CpG. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con el factor de necrosis tumoral (TNF) alfa. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con IL-1. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con HMGB1. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un antagonista de IL-10. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un antagonista de IL-4. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un antagonista de IL-13. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un antagonista de IL-17. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un antagonista de HVEM. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto

- con un agonista de ICOS, por ejemplo, por administración de ICOS-L, o un anticuerpo agonista dirigido frente a ICOS. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un tratamiento dirigido a CX3CL1. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un tratamiento dirigido a CXCL9. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano  
5 junto con un tratamiento dirigido a CXCL10. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un tratamiento dirigido a CCL5. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un agonista de LFA-1 o ICAM1. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un agonista de selectina.
- 10 En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de B-Raf. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con vemurafenib (también conocido como Zelboraf®). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con dabrafenib (también conocido como Tafinlar®). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con encorafenib (LGX818).
- 15 En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de EGFR. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con erlotinib (también conocido como Tarceva®). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de EGFR-T790M. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano  
20 junto con gefitinib. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con afatinib. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con cetuximab (también conocido como Erbitux®). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con panitumumab (también conocido como Vectibix®). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con rociletinib. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con AZD9291. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de una MEK, tal como MEK1 (también conocida como MAP2K1) y/o MEK2 (también conocida como MAP2K2). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con cobimetinib (también conocido como GDC-0973 o XL-518). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con trametinib (también conocido como Mekinist®). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con binimetinib.
- 30 En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de B-Raf (por ejemplo, vemurafenib o dabrafenib) y un inhibidor de MEK (por ejemplo, MEK1 y/o MEK2 (por ejemplo, cobimetinib o trametinib). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de ERK (por ejemplo, ERK1/2). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con GDC-0994). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de B-Raf, un inhibidor de MEK y un inhibidor de ERK1/2. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de EGFR, un inhibidor de MEK y un inhibidor de ERK1/2. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con uno o más inhibidores de la vía de MAP cinasa. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con CK127. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de K-Ras.
- 35 En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de c-Met. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con onartuzumab (también conocido como MetMab). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de cinasa del linfoma anaplásico (ALK). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con AF802 (también conocido como CH5424802 o alectinib). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con crizotinib. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con ceritinib. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de una fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con buparlisib (BKM-120). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con pictilisib (también conocido como GDC-0941). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con buparlisib (también conocido como BKM-120). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con perifosina (también conocido como KRX-0401). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor delta selectivo de una fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con idelalisib (también conocido como GS-1101 o CAL-101). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con taselisib (también conocido como GDC-0032). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con BYL-719. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de una Akt. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con MK2206. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con GSK690693. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con ipatasertib (también conocido como GDC-0068). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de mTOR. En algunos aspectos, se puede
- 65

administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con sirólimus (también conocido como rapamicina). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con temsirólimus (también conocido como CCI-779 o Torisel®). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con everólimus (también conocido como RAD001). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con ridaforólimus (también conocido como AP-23573, MK-8669 o deforólimus). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con OSI-027. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con AZD8055. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con INK128. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de PI3K/mTOR doble. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con XL765. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con GDC-0980. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con BEZ235 (también conocido como NVP-BEZ235). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con BGT226. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con GSK2126458. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con PF-04691502. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con PF-05212384 (también conocido como PKI-587).

En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un agente que degrada de forma selectiva el receptor estrogénico. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con GDC-0927. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de HER3. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con duligotuzumab. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de LSD1. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de MDM2. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de BCL2. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con venetoclax. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de CHK1. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con GDC-0575. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un inhibidor de la vía de señalización Hedgehog activada. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con ERIVEDGE.

En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con radioterapia. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con gemcitabina. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con nab-paclitaxel (ABRAXANE). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con trastuzumab. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con TVEC. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con IL27. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con ciclofosfamida. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un agente que recluta linfocitos T en el tumor. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con lirilumab (IPH2102/BMS-986015). En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con idelalisib. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un anticuerpo que se dirige a CD3 y CD20. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con REGN1979. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un anticuerpo que se dirige a CD3 y CD19. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con blinatumomab.

En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con un virus oncolítico. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con carboplatino y nab-paclitaxel. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con carboplatino y paclitaxel. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con cisplatino y pemetrexed. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con cisplatino y gemcitabina. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con FOLFOX. En algunos aspectos, se puede administrar un anticuerpo agonista anti-OX40 humano junto con FOLFIRI.

Dichas politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención se puede producir antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente y/o adyuvante terapéutico adicional. Los anticuerpos de la invención también se pueden usar en combinación con radioterapia.

Un anticuerpo como se divulga en el presente documento (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular,

intravenosa, intrarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o prolongada. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación que incluyen, pero sin limitarse a, administraciones únicas o múltiples durante diversos puntos de tiempo, administración con inyección intravenosa rápida e infusión pulsada.

Los anticuerpos como se divulga en el presente documento se formularían, dosificarían y administrarían de una forma consecuyente con la buena práctica médica. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los médicos de cabecera. No es necesario, pero el anticuerpo se formula opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosificaciones y por las vías de administración como se describe en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que sea apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo como se divulga en el presente documento (cuando se usa solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y evolución de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la anamnesis del paciente y de la respuesta al anticuerpo y del criterio del médico especialista. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 40 mg/kg de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas o por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, en general, se prolongaría el tratamiento hasta que se produjera una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Dichas dosis se pueden administrar de forma intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis de carga mayor inicial, seguido de una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. La progresión de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que se puede llevar a cabo cualquiera de las formulaciones o procedimientos terapéuticos anteriores usando un inmunocombinado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-OX40.

### III. ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN Y KITS

En otro aspecto se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una ficha técnica o prospecto del envase en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que por sí misma o combinada con otra composición es eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y que puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo de la invención. La ficha técnica o prospecto del envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo de fabricación puede comprender además un prospecto del envase que indique que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWF1), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

En algunos aspectos, se divulga un kit que comprende un medicamento que comprende un anticuerpo agonista anti-OX40 humano descrito en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable opcional. En algunos aspectos, el kit comprende además instrucciones para la administración del medicamento para el tratamiento del cáncer.

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunocombinado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-OX40.

**Secuencias**

Nombre	SECUENCIA	SEQ ID NO:
OX40 humano (que carece del péptido señal)	LHCVGDITYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSQNTVCRPCGPG FYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAG TQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHT LQPASNSSDAICFDRI DPPA TQPQETQGP PARPTIVQPT HAWPRT SQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRR DQRLPPDAHKKPPGGGSRFTPIQEEQADAHSTLAKI	1
HVR-H1- 1A7.gr.1 1A7.gr.2 1A7.gr.3 1A7.gr.4 1A7.gr.5 1A7.gr.5' 1A7.gr.6 1A7.gr.7 1A7.gr.7' 1A7.gr.NADS 1A7.gr.NADA 1A7.gr.NGDA 1A7.gr.SGDS 1A7.gr.NGSS 1A7.Ala.1 1A7.Ala.2 1A7.Ala.3 1A7.Ala.4 1A7.Ala.5 1A7.Ala.6 1A7.Ala.7 1A7.Ala.8 1A7.Ala.9 1A7.Ala.10 1A7.Ala.11 1A7.Ala.12 1A7.Ala.13 1A7.Ala.14 1A7.Ala.15 1A7.Ala.16	DSYMS	2
HVR-H2- 1A7.gr.1 1A7.gr.2 1A7.gr.3 1A7.gr.4 1A7.gr.5 1A7.gr.5' 1A7.gr.6 1A7.gr.7 1A7.gr.7' 1A7.gr.DA 1A7.gr.ES 1A7.Ala.1 1A7.Ala.2 1A7.Ala.3 1A7.Ala.4 1A7.Ala.5 1A7.Ala.6 1A7.Ala.7 1A7.Ala.8 1A7.Ala.9	DMYPDNGDSSYNQKFRE	3



1A7.Ala.10 1A7.Ala.11 1A7.Ala.12 1A7.Ala.13 1A7.Ala.14 1A7.Ala.15 1A7.Ala.16		
HVR-H3- 1A7.gr.1 1A7.gr.2 1A7.gr.3 1A7.gr.4 1A7.gr.5 1A7.gr.5' 1A7.gr.6 1A7.gr.7 1A7.gr.7' 1A7.gr.DA 1A7.gr.ES 1A7.gr.NADS 1A7.gr.NADA 1A7.gr.NGDA 1A7.gr.SGDS 1A7.gr.NGSS 1A7.gr.DANADA 1A7.Ala.1 1A7.Ala.2 1A7.Ala.3 1A7.Ala.4 1A7.Ala.5 1A7.Ala.6 1A7.Ala.7 1A7-Ala.15 1A7.Ala.16	APRWYFSV	4
HVR-L1- 1A7.gr.1 1A7.gr.2 1A7.gr.3 1A7.gr.4 1A7.gr.5 1A7.gr.5' 1A7.gr.6 1A7.gr.7 1A7.gr.7' 1A7.gr.DA 1A7.gr.ES 1A7.gr.NADS 1A7.gr.NADA 1A7.gr.NGDA 1A7.gr.SGDS 1A7.gr.NGSS 1A7.gr.DANADA 1A7.Ala.1 1A7.Ala.2 1A7.Ala.3 1A7.Ala.4 1A7.Ala.5 1A7.Ala.6 1A7.Ala.7 1A7.Ala.8 1A7.Ala.9 1A7.Ala.10 1A7.Ala.11 1A7.Ala.12	RASQDISNYLN	5

<p>1A7.Ala.13 1A7.Ala.14 1A7.Ala.15 1A7.Ala.16</p>		
<p>HVR-L2- 1A7.gr.1 1A7.gr.2 1A7.gr.3 1A7.gr.4 1A7.gr.5 1A7.gr.5' 1A7.gr.6 1A7.gr.7 1A7.gr.7' 1A7.gr.DA 1A7.gr.ES 1A7.gr.NADS 1A7.gr.NADA 1A7.gr.NGDA 1A7.gr.SGDS 1A7.gr.NGSS 1A7.gr.DANADA 1A7.Ala.1 1A7.Ala.2 1A7.Ala.3 1A7.Ala.4 1A7.Ala.5 1A7.Ala.6 1A7.Ala.7 1A7.Ala.8 1A7.Ala.9 1A7.Ala.10 1A7.Ala.11 1A7.Ala.12 1A7.Ala.13 1A7.Ala.14 1A7.Ala.15 1A7.Ala.16</p>	<p><b>YTSRLRS</b></p>	<p>6</p>
<p>HVR-L3- 1A7.gr.1 1A7.gr.2 1A7.gr.3 1A7.gr.4 1A7.gr.5 1A7.gr.5' 1A7.gr.6 1A7.gr.7 1A7.gr.7' 1A7.gr.DA 1A7.gr.ES 1A7.gr.NADS 1A7.gr.NADA 1A7.gr.NGDA 1A7.gr.SGDS 1A7.gr.NGSS 1A7.gr.DANADA 1A7.Ala.8 1A7.Ala.9 1A7.Ala.10 1A7.Ala.11 1A7.Ala.12 1A7.Ala.13 1A7.Ala.14</p>	<p><b>QQGITLPPT</b></p>	<p>7</p>

1A7.Ala.15 1A7.Ala.16		
HVR-H1- 1A7.gr.DA	DAYMS	8
HVR-H1- 1A7.gr.ES 1A7.gr.DANADA	ESYMS	9
HVR-H2- 1A7.gr.NADS	DMYPDNADSSYNQKFRE	10
HVR-H2- 1A7.gr.NADA 1A7.gr.DANADA	DMYPDNADASYNQKFRE	11
HVR-H2- 1A7.gr.NGDA	DMYPDNGDASYNQKFRE	12
HVR-H2- 1A7.gr.SGDS	DMYPDSDGDSSYNQKFRE	13
HVR-H2- 1A7.gr.NGSS	DMYPDNGSSSYNQKFRE	14
HVR-H3- 1A7.Ala.8	APRWYFSA	15
HVR-H3- 1A7.Ala.9	APRWYASV	16
HVR-H3- 1A7.Ala.10	APRWAFSV	17
HVR-H3- 1A7.Ala.11	APAWYFSV	18
HVR-H3- 1A7.Ala.12	APRWYFAV	19
HVR-H3- 1A7.Ala.13	APRAYFSV	20
HVR-H3- 1A7.Ala.14	AARWYFSV	21
HVR-L3- 1A7.Ala.1	QQGITLPT	22
HVR-L3- 1A7.Ala.2	QQGITAPPT	23
HVR-L3- 1A7.Ala.3	QQGATLPT	24
HVR-L3- 1A7.Ala.4	QQGHALPT	25
HVR-L3- 1A7.Ala.5	QQAITLPT	26
HVR-L3-	QQGITLAPT	27

1A7.Ala.6		
HVR-L3-1A7.Ala.7	QAGIITLPTT	28
HVR-H1-3C8.gr.1 3C8.gr.2 3C8.gr.3 3C8.gr.4 3C8.gr.5 3C8.gr.5.SG 3C8.gr.5.EG 3C8.gr.5.QG 3C9.gr.5.DQ 3C8.gr.5.DA 3C8.gr.6 3C8.gr.7 3C8.gr.8 3C8.gr.9 3C8.gr.10 3C8.gr.11 3C8.A.1 3C8.A.2 3C8.A.3 3C8.A.4 3C8.A.5 3C8.A.6 3C8.A.7 3C8.A.8 3C8.A.9 3C8.A.10	NYLIE	29
HVR-H2-3C8.gr.1 3C8.gr.2 3C8.gr.3 3C8.gr.4 3C8.gr.5 3C8.gr.5.SG 3C8.gr.5.EG 3C8.gr.5.QG 3C8.gr.6 3C8.gr.7 3C8.gr.8 3C8.gr.9 3C8.gr.10 3C8.gr.11 3C8.A.1 3C8.A.2 3C8.A.3 3C8.A.4 3C8.A.5 3C8.A.6 3C8.A.7 3C8.A.8 3C8.A.9 3C8.A.10	VINPGSGDTYYSEKFKG	30
HVR-H2-3C8.gr.5.DA	VINPGSGDAYYSEKFKG	31
HVR-H2-3C8.gr.5.DQ	VINPGSGDQYYSEKFKG	32

HVR-H3- 3C8.gr.1 3C8.gr.2 3C8.gr.3 3C8.gr.4 3C8.gr.5 3C8.gr.5.SG 3C8.gr.5.EG 3C8.gr.5.QG 3C8.gr.5.DA 3C8.gr.5.DQ 3C8.gr.6 3C8.gr.7 3C8.gr.8 3C8.gr.9 3C8.gr.10 3C8.gr.11 3C8.A.1 3C8.A.2 3C8.A.3 3C8.A.4 3C8.A.5 3C8.A.6 3C8.A.7	DRLDY	33
HVR-H3- 3C8.A.8	ARLDY	34
HVR-H3- 3C8.A.9	DALDY	35
HVR-H3- 3C8.A.10	DRADY	36
HVR-L1- 3C8.gr.1 3C8.gr.2 3C8.gr.3 3C8.gr.4 3C8.gr.5 3C8.gr.5.SG 3C8.gr.5.EG 3C8.gr.5.QG 3C8.gr.5.DA 3C8.gr.5.DQ 3C8.gr.6 3C8.gr.7 3C8.gr.8 3C8.gr.9 3C8.gr.10 3C8.gr.11 3C8.A.1 3C8.A.2 3C8.A.3 3C8.A.4 3C8.A.5 3C8.A.6 3C8.A.7 3C8.A.8 3C8.A.9 3C8.A.10	HASQDISSYIV	37
HVR-L2- 3C8.gr.1 3C8.gr.2	HGTNLED	38

3C8.gr.3 3C8.gr.4 3C8.gr.5 3C8.gr.5.DA 3C8.gr.5.DQ 3C8.gr.6 3C8.gr.7 3C8.gr.8 3C8.gr.9 3C8.gr.10 3C8.gr.11 3C8.A.1 3C8.A.2 3C8.A.3 3C8.A.4 3C8.A.5 3C8.A.6 3C8.A.7 3C8.A.8 3C8.A.9 3C8.A.10		
HVR-L2-3C8.gr5.SG	IIGTNLES	39
HVR-L2-3C8.gr.5.EG	HGTNLEE	40
HVR-L2-3C8.gr.5.QG	IIGTNLEQ	41
HVR-L3 3C8.gr.1 3C8.gr.2 3C8.gr.3 3C8.gr.4 3C8.gr.5 3C8.gr.5.SG 3C8.gr.5.EG 3C8.gr.5.QG 3C8.gr.5.DA 3C8.gr.5.DQ 3C8.gr.6 3C8.gr.7 3C8.gr.8 3C8.gr.9 3C8.gr.10 3C8.gr.11 3C8.A.8 3C8.A.9 3C8.A.10	VIIYAQFPYT	42
HVR-L3-3C8.A.1	AHYAQFPYT	43
HVR-L3-3C8.A.2	VAYAQFPYT	44
HVR-L3-3C8.A.3	VIIAAQFPYT	45
HVR-L3-3C8.A.4	VIIYAAFPYT	46

HVR-L3-3C8.A.5	VIIYAQAPYT	47
HVR-L3-3C8.A.6	VIIYAQFAYT	48
HVR-L3-3C8.A.7	VIIYAQFPAT	49
HVR-H1-1D2.gr.1 1D2.gr.2 1D2.gr.3	DYGVL	50
HVR-H2-1D2.gr.1 1D2.gr.2 1D2.gr.3	MIWSSGGTTDYNAAFIS	51
HVR-H3-1D2.gr.1 1D2.gr.2 1D2.gr.3	LEMDY	52
HVR-L1-1D2.gr.1 1D2.gr.2 1D2.gr.3	RASQDISNFLN	53
HVR-L2-1D2.gr.1 1D2.gr.2 1D2.gr.3	YTSRLIIS	54
HVR-L3-1D2.gr.1 1D2.gr.2 1D2.gr.3	QQGNILPWT	55
1A7.gr.1 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTLVTVSS	56
1A7.gr.1 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGGTDFLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPPTFGQGTKVEIK	57
1A7.gr.2 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITVDTSTSTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTLVTVSS	58
1A7.gr.2 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGGTDFLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPPTFGQGTKVEIK	59
1A7.gr.3 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTLVTVSS	60
1A7.gr.3 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGGTDFLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPPTFGQGTKVEIK	61
1A7.gr.4 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITVDTSTSTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTLVTVSS	62

1A7.gr.4 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSI.SASVGDRVTITCRASQDISNYL.NWYQQKPGKT VKLLIYYTISRI.RSGVPSRFSGSGSGTDFTL.TISSI.QPEDFATYYC QQGHITL.PPTFGQGTKVEIK	63
1A7.gr.5 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITVDTSTSTAYLELS SLRSEDVAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTILVTVSS	64
1A7.gr.5 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSI.SASVGDRVTITCRASQDISNYL.NWYQQKPGKT VKLLIYYTISRI.RSGVPSRFSGSGSGTDFTL.TISSI.QPEDFATYYC QQGHITL.PPTFGQGTKVEIK	65
1A7.gr.6 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITVDTSTSTAYLELS SLRSEDVAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTILVTVSS	66
1A7.gr.6 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYL.NWYQQKPGKT VKLLIYYTISRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTL.TISSI.QPEDFATYYC QQGHITL.PPTFGQGTKVEIK	67
1A7.gr.7 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITVDTSTSTAYLELS SLRSEDVAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTILVTVSS	68
1A7.gr.7 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYL.NWYQQKPGKT VKLLIYYTISRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTL.TISSI.QPEDFATYYC QQGHITL.PPTFGQGTKVEIK	69
1A7.gr.DA V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDAYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDISTSTAYLELS SLRSEDVAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTILVTVSS	70
1A7.gr.DA V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSI.SASVGDRVTITCRASQDISNYL.NWYQQKPGKA PKLLIYYTISRI.RSGVPSRFSGSGSGTDFTL.TISSI.QPEDFATYYC QQGHITL.PPTFGQGTKVEIK	71
1A7.gr.ES V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTESYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDISTSTAYLELS SLRSEDVAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTILVTVSS	72
1A7.gr.ES V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYL.NWYQQKPGKA PKLLIYYTISRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTL.TISSI.QPEDFATYYC QQGHITL.PPTFGQGTKVEIK	73
1A7.gr.NADS V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNADSSYNQKFRERVTITRDISTSTAYLELS SLRSEDVAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTILVTVSS	74
1A7.gr.NADS V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSI.SASVGDRVTITCRASQDISNYL.NWYQQKPGKA PKLLIYYTISRI.RSGVPSRFSGSGSGTDFTL.TISSI.QPEDFATYYC QQGHITL.PPTFGQGTKVEIK	75
1A7.gr.NADA V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNADASYNQKFRERVTITRDISTSTAYLELS SLRSEDVAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTILVTVSS	76
1A7.gr.NADA V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYL.NWYQQKPGKA PKLLIYYTISRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTL.TISSI.QPEDFATYYC QQGHITL.PPTFGQGTKVEIK	77
1A7.gr.NGDA V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDASYNQKFRERVTITRDISTSTAYLELS SLRSEDVAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTILVTVSS	78
1A7.gr.NGDA V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYL.NWYQQKPGKA PKLLIYYTISRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTL.TISSI.QPEDFATYYC QQGHITL.PPTFGQGTKVEIK	79



1A7.gr.SGDS V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYFDNADASYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTITVTVSS	80
1A7.gr.SGDS V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPPTFGQGTKVEIK	81
1A7.gr.NGSS V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYFDNGDASYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTITVTVSS	82
1A7.gr.NGSS V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPPTFGQGTKVEIK	83
1A7.gr.DANAD A V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYFDNGDASYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTITVTVSS	84
1A7.gr.DANAD A V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPPTFGQGTKVEIK	85
1A7.Ala.1 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYFDSDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTITVTVSS	86
1A7.Ala.1 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPPTFGQGTKVEIK	87
1A7.Ala.2 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYFDNGSSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTITVTVSS	88
1A7.Ala.2 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTAPPPTFGQGTKVEIK	89
1A7.Ala.3 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYFDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTITVTVSS	90
1A7.Ala.3 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGATLPPTFGQGTKVEIK	91
1A7.Ala.4 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYFDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTITVTVSS	92
1A7.Ala.4 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPPTFGQGTKVEIK	93
1A7.Ala.5 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYFDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTITVTVSS	94
1A7.Ala.5 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPPTFGQGTKVEIK	95
1A7.Ala.6 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYFDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTITVTVSS	96

1A7.Ala.6 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPTTFGQGTKVEIK	97
1A7.Ala.7 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSISTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTLVTVSS	98
1A7.Ala.7 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QAGHTLPTTFGQGTKVEIK	99
1A7.Ala.8 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSISTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSAWGQGTLVTVSS	100
1A7.Ala.8 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPTTFGQGTKVEIK	101
1A7.Ala.9 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSISTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYASVWGQGTLVTVSS	102
1A7.Ala.9 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPTTFGQGTKVEIK	103
1A7.Ala.10 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSISTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWAFSVWGQGTLVTVSS	104
1A7.Ala.10 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPTTFGQGTKVEIK	105
1A7.Ala.11 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSISTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTLVTVSS	106
1A7.Ala.11 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPTTFGQGTKVEIK	107
1A7.Ala.12 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSISTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTLVTVSS	108
1A7.Ala.12 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPTTFGQGTKVEIK	109
1A7.Ala.13 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSISTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTLVTVSS	110
1A7.Ala.13 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPTTFGQGTKVEIK	111
1A7.Ala.14 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSISTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTLVTVSS	112

1A7.Ala.14 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPTFGQGTKVEIK	113
1A7.Ala.15 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTLVTVSS	114
1A7.Ala.15 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPTFGQGTKVEIK	115
1A7.Ala.16 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTLVTVSS	116
1A7.Ala.16 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPTFGQGTKVEIK	117
3C8.gr.1 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTITRDTSTSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLVTVSS	118
3C8.gr.1 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKAP KLLIYHIGTINLEDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC VHYAQFPYTFGQGTKVEIK	119
3C8.gr.2 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTLVTVSS	120
3C8.gr.2 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLPTFGQGTKVEIK	121
3C8.gr.3 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTITRDTSTSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLVTVSS	122
3C8.gr.3 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKAP KLLIYHIGTINLEDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC VHYAQFPYTFGQGTKVEIK	123
3C8.gr.4 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTITRDTSTSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLVTVSS	124
3C8.gr.4 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKAP KLLIYHIGTINLEDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC VHYAQFPYTFGQGTKVEIK	125
3C8.gr.5 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTITRDTSTSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLVTVSS	126
3C8.gr.5 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKAP KLLIYHIGTINLEDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC VHYAQFPYTFGQGTKVEIK	127
3C8.gr.5.SG V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTITRDTSTSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLVTVSS	128

3C8.gr.5.SG V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCIIASQDISSYIVWYQQKPGKSF KGLIYHIGTINLESGVPSRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDEATYYCV IHYAQFPYTFGQGTKVEIK	129
3C8.gr.5.EG V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTTIRDTSTSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLVTVSS	130
3C8.gr.5.EG V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCIIASQDISSYIVWYQQKPGKAP KLLIYHIGTINLEDGVPSPRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDEATYYC VHYAQFPYTFGQGTKVEIK	131
3C8.gr.5.QG V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTTIRDTSTSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLVTVSS	132
3C8.gr.5.QG V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCIIASQDISSYIVWYQQKPGKAP KLLIYHIGTINLEDGVPSPRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDEATYYC VHYAQFPYTFGQGTKVEIK	133
3C8.gr.6 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTTIRDTSTSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLVTVSS	134
3C8.gr.6 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCIIASQDISSYIVWYQQKPGKAP KLLIYHIGTINLEDGVPSPRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDEATYYC VHYAQFPYTFGQGTKVEIK	135
3C8.gr.7 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTTIRDTSTSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLVTVSS	136
3C8.gr.7 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCIIASQDISSYIVWYQQKPGKAP KLLIYHIGTINLEDGVPSPRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDEATYYC VHYAQFPYTFGQGTKVEIK	137
3C8.gr.8 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTTIRDTSTSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLVTVSS	138
3C8.gr.8 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCIIASQDISSYIVWYQQKPGKAP KLLIYHIGTINLEDGVPSPRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDEATYYC VHYAQFPYTFGQGTKVEIK	139
3C8.gr.9 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTTIRDTSTSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLVTVSS	140
3C8.gr.9 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCIIASQDISSYIVWYQQKPGKAP KLLIYHIGTINLEDGVPSPRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDEATYYC VHYAQFPYTFGQGTKVEIK	141
3C8.gr.10 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTTIRDTSTSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLVTVSS	142
3C8.gr.10 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCIIASQDISSYIVWYQQKPGKAP KLLIYHIGTINLEDGVPSPRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDEATYYC VHYAQFPYTFGQGTKVEIK	143
3C8.gr.11 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTTIRDTSTSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLVTVSS	144



3C8.gr.11 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCHASQDISSYIVWYQQKPGKAP KLLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDFATYYC VHYAQFPYTFGQGTKVEIK	145
3C8.A.1 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTTTRDTSSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLLTVSS	146
3C8.A.1 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCHASQDISSYIVWYQQKPGKSF KGLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDFATYYC AIIYAQFPYTFGQGTKVEIK	147
3C8.A.2 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTTTRDTSSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLLTVSS	148
3C8.A.2 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCHASQDISSYIVWYQQKPGKSF KGLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDFATYYC VAYAQFPYTFGQGTKVEIK	149
3C8.A.3 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTTTRDTSSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLLTVSS	150
3C8.A.3 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCHASQDISSYIVWYQQKPGKSF KGLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDFATYYC VHAAQFPYTFGQGTKVEIK	151
3C8.A.4 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTTTRDTSSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLLTVSS	152
3C8.A.4 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCHASQDISSYIVWYQQKPGKSF KGLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDFATYYC VIIYAAPYTFGQGTKVEIK	153
3C8.A.5 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTTTRDTSSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLLTVSS	154
3C8.A.5 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCHASQDISSYIVWYQQKPGKSF KGLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDFATYYC VHYAQAPYTFGQGTKVEIK	155
3C8.A.6 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTTTRDTSSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLLTVSS	156
3C8.A.6 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCHASQDISSYIVWYQQKPGKSF KGLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDFATYYC VIIYAQAPYTFGQGTKVEIK	157
3C8.A.7 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTTTRDTSSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLLTVSS	158
3C8.A.7 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCHASQDISSYIVWYQQKPGKSF KGLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDFATYYC VHYAQFPATFGQGTKVEIK	159
3C8.A.8 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTTTRDTSSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLLTVSS	160

3C8.A.8 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCHASQDISSYIVWYQQKPGKAP KLLIYHIGTINLEDGVPSRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDFATYYC VHYAQFPYTFGQGTKVEIK	161
3C8.A.9 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTTTRDITSTSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGLTVTVSS	162
3C8.A.9 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCHASQDISSYIVWYQQKPGKAP KLLIYHIGTINLEDGVPSRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDFATYYC VHYAQFPYTFGQGTKVEIK	163
3C8.A.10 V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYAFTNYLIEWVRQAPG QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTTTRDITSTSTAYLELSSL RSEDTAVYYCARDRLDYWGQGLTVTVSS	164
3C8.A.10 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCHASQDISSYIVWYQQKPGKAP KLLIYHIGTINLEDGVPSRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDFATYYC VHYAQFPYTFGQGTKVEIK	165
ID2.gr.1 V <sub>H</sub>	EVQLVESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTDYGVLWIRQPPGK GLEWIGMIWSSGTTDYNAAFISRVTISVDTSKNQFSLKLSVTA ADTAVYYCVREEMDYWGQGLTVTVSS	166
ID2.gr.1 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDISNFLNWIYQQKPGKA PKLLIYYISRLIISGVPSRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDFATYYC QQGNTLPWTFGQGTKVEIK	167
ID2.gr.2 V <sub>H</sub>	EVQLVESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTDYGVLWIRQPPGK GLEWIGMIWSSGTTDYNAAFISRVTISKDTSKNQVSLKLSVTA AADTAVYYCVREEMDYWGQGLTVTVSS	168
ID2.gr.2 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDISNFLNWIYQQKPGKA PKLLIYYISRLIISGVPSRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDFATYYC QQGNTLPWTFGQGTKVEIK	169
ID2.gr.3 V <sub>H</sub>	EVQLVESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTDYGVLWVRQPPGK GLEWLGMIWSSGTTDYNAAFISRLTISKDTSKNQVSLKLSVTA AADTAVYYCVREEMDYWGQGLTVTVSS	170
ID2.gr.3 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDISNFLNWIYQQKPGKA PKLLIYYISRLIISGVPSRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDFATYYC QQGNTLPWTFGQGTKVEIK	171
CON1 (1A7) HVR-H1	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> YMS, en la que X <sub>1</sub> es D o E y X <sub>2</sub> es S o A	172
CON1 (1A7) HVR-H2	DMYPDX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> SYNQKFRE, en la que X <sub>1</sub> es N o S, X <sub>2</sub> es A o G, X <sub>3</sub> es D o S y X <sub>4</sub> es A o S	173
CON1 (1A7) HVR-H3	APRWX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> , en la que X <sub>1</sub> es Y o A, X <sub>2</sub> es A o F, X <sub>3</sub> es S o A y X <sub>4</sub> es A o V.	174
CON1 (1A7) HVR-L3	QX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> T, en la que X <sub>1</sub> es A o Q, X <sub>2</sub> es A o G, X <sub>3</sub> es A o H, X <sub>4</sub> es A o T, X <sub>5</sub> es A o L, X <sub>6</sub> es A o P y X <sub>7</sub> es A o P.	175
CON2 (3C8) HVR-H2	VINPGSGDX <sub>1</sub> YYSEKFKG, en la que X <sub>1</sub> es T, A o Q.	176
CON2 (3C8) HVR-L2	HGTNLEX <sub>1</sub> , en la que X <sub>1</sub> es S, E o Q.	177
CON2 (3C8) HVR-L3	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> YAQFPYX <sub>3</sub> , en la que X <sub>1</sub> es V o A, X <sub>2</sub> es H o A y X <sub>3</sub> es Y o A.	178
1A7 V <sub>L</sub>	DIQMTQTSSLSASLGDRTTISCRASQDISNYLNWIYQQKPDGT VKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGKDYFLTISNLEQEDVAAYF CQQGHTLPPTFGGGTKLEIK	179



1A7 V <sub>H</sub>	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDSYMSWVKQSHG KTLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRKRVTLTVDKSSITAYMEFR SLTSEDSAVYYCVLAPRWYFSVWGTGTTVTVSS	180
3C8 V <sub>L</sub>	DILMTQSPSSMSVSLGDTVSITCHASQDISSYIVWLQKPKGKSF RGLIYHGFTNLEDGIPSRFSGSGSGADYSLTISSLESEDFADYYCV HYAQFPYTFGGGKLEIK	181
3C8 V <sub>H</sub>	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSKASGYAFTNYLIEWVKQRPG QGILEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADKSSITAYMQI.SS LTSEDSAVYFCARDRLDYWGQGITLTVSS	182
1A7.gr.5' V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVILTVDISTISTAYLEL SSLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGGQGITLTVSS	183
1A7.gr.7' V <sub>H</sub>	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVILTVDISTISTAYLEL SSLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGGQGITLTVSS	184

## EJEMPLOS

## MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

- 5 **Resonancia de plasmón superficial:** Se midió la cinética de unión de los anticuerpos anti-OX40 usando resonancia de plasmón superficial (RPS) en un instrumento Biacore 3000 (GE Healthcare). Se inmovilizó anti-Fc humana (GE Healthcare) en una matriz de sensor CM5 por medio de acoplamiento basado en amina usando el protocolo proporcionado por el fabricante. Se capturó el anticuerpo anti-OX40 a un nivel de 300-400 unidades de resonancia (UR). Se midió la unión del anticuerpo a OX40 humano (Sino Biological Inc). Se usaron series de concentraciones de dos veces de huOX40 con un intervalo de 18,75 a 300 nM o bien 6,25 a 200 nM para los experimentos. Se registraron sensogramas para la unión de OX40 usando un tiempo de inyección de 2 minutos con un caudal de 30 µl/min, a una temperatura de 25 °C y con un tampón de migración de HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,005 %. Después de la inyección, se supervisó la disociación del ligando del anticuerpo durante 600 segundos en tampón de migración. La superficie se regeneró entre ciclos de unión con una inyección de 40 µl de cloruro de magnesio 3 M. Después de la resta de un blanco que solo contenía tampón de migración, se analizaron los sensogramas observados para la unión de OX40 a anticuerpos anti-OX40 usando un modelo de unión 1:1 de Langmuir con un programa informático suministrado por el fabricante para calcular la cinética y las constantes de unión.
- 10
- 15
- 20 **Bloqueo cruzado:** Se realizaron experimentos de bloqueo cruzado usando resonancia de plasmón superficial (RPS) en un instrumento Biacore 3000 (GE Healthcare) como se describe anteriormente. Se usaron dos formatos para el análisis. Para el primero, se capturaron los anticuerpos originales derivados de hibridoma 1A7, 3C8 y 1D2 usando un anti-Fc murina (GE Healthcare) en diferentes cubetas de lectura. A continuación, se hizo fluir OX40 humano (Sino Biological Inc) por los anticuerpos durante 2 minutos permitiendo que se uniera. Esto estuvo seguido de una inyección de 2,5 minutos de clones de anticuerpo anti-OX40 1A7.gr.1, 3C8.gr.5 y 1D2.quimera. Un incremento de las unidades de resonancia (UR) indica que no hay bloqueo cruzado y ningún cambio en UR indica competencia. Para el segundo formato, se invirtió el formato de anticuerpo y se capturaron las variantes humanizadas usando anti-Fc humana (GE Healthcare). Esto estuvo seguido de una inyección de 2 minutos de huOX40 y, a continuación, los anticuerpos murinos. Cada uno de los clones se pudo unir en presencia de los otros dos clones y solo compitió por unirse por sí mismo.
- 25
- 30 **Generación de variantes de anticuerpo:** Se generaron variantes de clones de anticuerpo agonista anti-OX40 humanizado 1A7, 3C8 y 1D2 usando mutagénesis de Kunkel. Se expresaron de forma transitoria anticuerpos variantes en células 293 y, a continuación, se analizaron para determinar su unión y función.
- 35 **Análisis por FACS:** La línea de linfocitos T humanos Hut78 se transfectó de forma estable con OX40 humano, y se sometieron a prueba los clones de anticuerpo anti-OX40 humanizado por FACS usando las células Hut78-OX40 para evaluar si las variantes retenían la unión a OX40 expresado en la superficie celular. Después del bloqueo con tampón de bloqueo para FACS (1X PBS, BSA al 0,5 %, acida de Na al 0,05 %), se tiñeron las células durante 30 minutos en hielo con 0,1, 1,0 o bien 10,0 µg/ml de anticuerpo. Después de la tinción, se lavaron 2x las células con tampón para FACS frío (1X PBS, BSA al 0,5 %, acida de Na al 0,05 %). A continuación, se tiñeron las células con anti-huFc-ficoeritrina (PE) o anti-muFc-PE durante 30 minutos en hielo. Se lavaron 3x las células teñidas con tampón para FACS frío antes de la lectura en un FACSCalibur, seguido de análisis usando el programa informático Flowjo.
- 40
- 45 **Pruebas de estabilidad:** los anticuerpos agonistas anti-OX40 se sometieron a análisis de estabilidad, incluyendo pruebas de agresión por calor y pruebas de agresión química. Para las pruebas de calor, se trataron las muestras de

anticuerpo formulado a 40 °C durante dos semanas, a continuación, se sometieron a análisis, por ejemplo, para determinar la presencia de residuos de aminoácido isomerizados o desaminados en los residuos de CDR, como se determina usando cartografía tripsínica usando CL-EM/EM. Para las pruebas químicas, se sometieron las muestras de anticuerpo formulado a condiciones oxidantes (por ejemplo, usando AAPH como agente oxidante), a continuación, se analizaron para determinar la presencia de residuos oxidados (por ejemplo, M o W) en CDR usando cartografía tripsínica usando CL-EM/EM.

Análisis de unión en equilibrio del anticuerpo agonista frente a OX40 1A7.gr.1 a la proteína OX40 humana recombinante expresada en células BT-474 transfectadas: Se yodó mab 1A7.gr.1 usando el procedimiento de Iodogen (Fraker y Speck 1978). El mab 1A7.gr.1 radiomarcado se purificó de <sup>125</sup>I-Na libre por filtración en gel usando una columna NAP-5; el anticuerpo purificado tenía una actividad específica de 24,3 µCi/µg. Se dispusieron mezclas de reacción de competencia de un volumen de 50 µl que contenían una concentración fijada de mab 1A7.gr.1 yodado y concentraciones decrecientes de mab 1A7.gr.1 no marcado diluido en serie en placas de 96 pocillos. Se cultivaron células BT-474 que expresaban OX40 humano transfectadas de forma estable a 37 °C en un 5 % de CO<sub>2</sub>. Se desprendieron las células del matraz usando solución de disociación celular (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) y se lavaron con tampón de unión (DMEM con FBS al 2 %, HEPES 50 mM, pH 7,2, acida de sodio 2 mM). Se añadieron las células lavadas a una densidad aproximada de 5 × 10<sup>4</sup> células en 0,2 ml de tampón de unión a las placas de 96 pocillos que contenían las mezclas de reacción de competencia de 50 µl. La concentración final del anticuerpo yodado en cada reacción de competencia con células fue de aproximadamente 100 pM (aproximadamente 16,0 × 10<sup>4</sup> rpm por 0,25 ml) y la concentración final del anticuerpo no marcado en la reacción de competencia con células varió, comenzando en 500 nM y disminuyendo en etapas de 3 veces para 10 concentraciones, seguido de una etapa con anticuerpo no marcado no añadido usando solo tampón de unión. Las reacciones de competencia con las células se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Se sometió a ensayo por triplicado la reacción de competencia con células a cada concentración de anticuerpo no marcado. Después de 2 horas de incubación, se transfirieron las reacciones de competencia a una placa de filtro Multiscreen® de Millipore (Millipore; Billerica, MA) y se lavaron cuatro veces con tampón de unión para separar el anticuerpo yodado libre del unido. Se contaron los filtros en un contador gamma Wallac Wizard 1470 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences Inc.; Wellesley, MA). Se evaluaron datos de unión usando el programa informático NewLigand (Genentech), que usa el algoritmo de ajuste de Munson y Rodbard para determinar la afinidad de unión del anticuerpo (Munson y Rodbard, 1980).

Unión del anticuerpo agonista frente a OX40 1A7.gr.1 a OX40 expresado en la superficie celular en linfocitos T humanos, de macaco cangrejero, de rata y de ratón a través de citometría de flujo: se obtuvieron glóbulos blancos periféricos (PBMC) de sangre completa humana, de macaco cangrejero de Mauricio, de rata o de ratón por lisis de glóbulos rojos usando tampón de lisis de eritrocitos (BD Bioscience; San Jose, CA). Las células se bloquearon con suero humano, de macaco cangrejero, de rata o de ratón al 10 %, respectivamente, en PBS durante 15 minutos a 4 °C y se sembraron en placa en una placa de 96 pocillos en un equivalente de 100 µl de sangre completa por reacción.

Se valoró mab 1A7.gr.1 marcado con Alexa Fluor® 647 (o control de anticuerpo trastuzumab marcado con Alexa Fluor® 647) y se unió a las células comenzando en 9 µg/ml en diluciones en serie de 3 veces para muestras de ser humano, de rata y de ratón, y 8 µg/ml en diluciones en serie de 2 veces para muestras de macaco cangrejero de Mauricio. Se tiñeron conjuntamente PBMC durante 30 minutos en la oscuridad a 4 °C para identificar a las poblaciones de subconjuntos de linfocitos T como sigue: anti-CD3-PE-Cy7, anti-PerCDP-Cy5.5, anti-CD8-BV510 humanos (BD Biosciences); anti-CD3-PE-Cy7, anti-CD4-PerCP-Cy5.5, anti-CD8-APC-H7 de macaco cangrejero (BD Biosciences); anti-CD3-PE, anti-CD4-FITC de rata (BD Biosciences); anti-CD3-FITC, anti-CD4-PE de ratón (eBioscience, San Diego, CA).

A continuación, se lavaron dos veces las células con tampón de tinción para FACS (BD Bioscience) y se fijaron con paraformaldehído al 1 % (EMS) en PBS antes de la adquisición de las muestras en un citómetro de flujo.

Todas las muestras se procesaron en un FACSCanto II de BD Biosciences. Se usó la tinción base del anticuerpo de control trastuzumab en linfocitos T para configurar la selección de análisis y normalizar la tinción mab 1A7.gr.1-Alexa 647. Se analizaron los datos adquiridos usando el programa informático BD FACSDiva.

**Coestimulación de linfocitos T efectores mediada por el anticuerpo agonista anti-OX40 1A7.gr.1:** Se recuperaron glóbulos blancos periféricos (PBMC) de sangre completa humana usando un dispositivo de aféresis Trima Accel y se enriquecieron adicionalmente por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque. (GE healthcare). Se aislaron linfocitos T de memoria CD4+ de PBMC usando el kit de aislamiento de linfocitos T de memoria CD4+ de Miltenyi (Miltenyi) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se irradiaron células L que expresaban CD32 y CD80 a 5000 Rads y se emplearon como células presentadoras de antígeno.

Se mezclaron células L CD32+ CD80+ irradiadas (5000 células/pocillo) con linfocitos T de memoria CD4+ (50000 células/pocillo) y se cultivaron a 37 °C en un 5 % de CO<sub>2</sub> en una placa de 96 pocillos. Los medios de cultivo consistieron en RPMI 1640 con FBS al 10 %, Gluta-MAX, piruvato de sodio, penicilina/estreptomicina, aminoácidos no esenciales y beta-mercaptoetanol.

Se activaron linfocitos T de memoria CD4+ en cocultivos de células L CD32+ CD80+ añadiendo 40 ng/ml de anti-CD3



(clon SP34) y (BD Biosciences) y cantidades variables de mab 1A7.gr.1 o control de isotipo (anti glucoproteína D de VHS, anti-gD) (diluido en serie dos veces de 320 ng/ml a 0,16 ng/ml). Se evaluaron los niveles de IFN-gamma en el sobrenadante por Luminex (Bio-Rad) en el día 5 de cultivo y se midió la proliferación de linfocitos T por luminiscencia mediante Cell Titer-Glo (Promega) y se leyó en un lector de múltiples marcadores EnVision (Perkin Elmer) en el día 7 de cultivo.

## RESULTADOS:

Los anticuerpos agonistas frente a OX40 se unieron a OX40 humano con afinidad subnanomolar. Se usó el análisis por resonancia de plasmón superficial para medir la cinética de unión de los anticuerpos anti-OX40 que se unían a OX40 humano. Las variantes de anticuerpo humanizado 1A7 mostraron alta afinidad de unión a OX40 humano como se mide por Biacore. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2: Constantes cinéticas para variantes de anticuerpo anti-OX40 humanizado 1A7 que se unen a OX40 humano**

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
1A7.gr.1	4,38e5	1,52e-4	0,529
1A7.gr.2	4,44e5	2,33e-4	0,524
1A7.gr.3	4,62e5	2,43e-4	0,525
1A7.gr.4	3,45e5	1,63e-4	0,472
1A7.gr.5'	2,78e5	4,92e-4	1,77
1A7.gr.6	3,91e5	6,93e-5	0,177
1A7.gr.7'	4,01e5	1,45e-4	0,360

Las variantes de anticuerpo humanizado 3C8 mostraron alta afinidad con respecto a huOX40. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3: Constantes cinéticas para variantes de anticuerpo anti-OX40 humanizado 3C8 que se unen a OX40 humano**

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
3C8.gr.1	4,12e5	2,67e-3	6,49
3C8.gr.2	4,66e5	2,55e-3	5,48
3C8.gr.3	4,98e5	1,96e-3	3,94
3C8.gr.4	4,2e5	9,23e-4	2,20
3C8.gr.5	4,57e5	6,19e-4	1,35
3C8.gr.6	3,95e5	1,22e-3	3,08
3C8.gr.7	4,86e5	6,85e-4	1,41
3C8.gr.8	3,29e5	7,09e-4	2,16
3C8.gr.9	4,04e5	1,73e-3	4,28
3C8.gr.10	3,82e5	1,08e-3	2,84
3C8.gr.11	3,21e5	9,17e-4	2,86
3C8.gr.12	5,5e5	1,58e-3	2,87
3C8.gr.13	4,65e5	9,17e-4	1,97
3C8.gr.14	5,12e5	8,58e-4	1,68
3C8.gr.15	5,2e5	7,83e-4	1,50

Las variantes humanizadas del anticuerpo 1D2 mostraron una unión reducida a huOX40 en comparación con el anticuerpo de hibridoma original. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4: Constantes cinéticas para variantes de anticuerpo anti-OX40 humanizado 1D2 que se unen a OX40 humano**

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
1D2.gr.1	Rápida en as	Rápida en dis	
1D2.gr.2	3,19e5	1,78e-2	55,9

1D2.gr.3	2,73e5	1,63e-2	59,5
----------	--------	---------	------

**Análisis por FACS:** Se analizaron variantes de anticuerpo frente a OX40 humanizado por FACS para evaluar la unión del anticuerpo a huOX40 expresado en la superficie de células Flut78. Los resultados de este análisis se muestran en la **FIG. 1**. Los anticuerpos agonistas anti-OX40 humanizados 1A7.gr.1, 1A7.gr.2, 1A7.gr.3, 3C8.gr.1, 3C8.gr.2 y 3C8.gr.3 se unen bien a OX40 humano expresado en la superficie celular.

**Experimentos de bloqueo cruzado:** Cada uno de los clones de anticuerpo se pudo unir en presencia de los otros dos clones, y solo compitió por su unión a OX40 humano por sí mismo, lo que sugiere que los anticuerpos 1A7, 3C8 y 1D2 no compiten por su unión a OX40 humano entre sí.

**Generación y caracterización de anticuerpos frente a OX40 variantes:** Se generaron variantes de los clones de anti-OX40 1A7.gr.1 y 3C8.gr.5 por mutagénesis de Kunkel para mutar motivos de residuos de CDR que eran potencialmente lábiles (por ejemplo, en condiciones de agresión por calor). Para el anticuerpo 1A7.gr.1, se identificaron las secuencias DS (D está en CDR H1; DS está potencialmente sometida a una isomerización incrementada) y NGDS (en CDR H2; NG está potencialmente sometida a una isomerización incrementada) como residuos potencialmente inestables y se mutaron como se muestra en la tabla 5. Se sometieron a prueba variantes por Biacore como se describe anteriormente para evaluar la cinética de unión y en ensayos de coestimulación para determinar la actividad biológica.

**Tabla 5: Mutaciones introducidas en variantes de mab 1A7.gr.1**

Anticuerpo	Cambio de secuencia (secuencia original → secuencia mutada)
1A7.gr.DA	CDR H1 DS→DA
1A7.gr.ES	CDR H1 DS→ES
1A7.gr.NADS	CDR H2 NGDS→NADS
1A7.gr.NADA	CDR H2 NGDS→NADA
1A7.gr.NGDA	CDR H2 NGDS→NGDA
1A7.gr.SGDS	CDR H2 NGDS→SGDS
1A7.gr.NGSS	CDR H2 NGDS→NGSS

La mutación de los residuos DS (D está en CDR H1) a DA o bien ES no alteró significativamente la afinidad de unión por huOX40 (tabla 6). La mutación de los residuos NGDS en CDR H2 a NADS, NADA, NGDA y NGSS tampoco alteró significativamente la afinidad de unión por OX40 humano. La mutación de NGDS (en CDR H2) a SGDS dio como resultado una pérdida de dos veces de la afinidad de unión (tabla 6). Se analizaron los anticuerpos variantes usando un ensayo de coestimulación de linfocitos T y el nivel de coestimulación de los linfocitos T efectores no se alteró significativamente en las variantes en comparación con el anticuerpo 1A7.gr.1 (datos no mostrados).

**Tabla 6: Constantes cinéticas para variantes de 1A7 anti-OX40 que se unen a OX40 humano**

		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
1A7.gr.1		3,23e5	1,29e-4	0,398
1A7.gr.DA	CDR H1 DS→DA	3,21e5	8,32e-5	0,259
1A7.gr.ES	CDR H1 DS→ES	3,41e5	1,09e-4	0,319
1A7.gr.NADS	CDR H2 NGDS→NADS	2,75e5	1,21e-4	0,442
1A7.gr.NADA	CDR H2 NGDS→NADA	3,04e5	1,08e-4	0,355
1A7.gr.NGDA	CDR H2 NGDS→NGDA	3,37e5	1,09e-4	0,322
1A7.gr.SGDS	CDR H2 NGDS → SGDS	2,30e5	2,28e-4	0,993
1A7.gr.NGSS	CDR H2 NGDS→NGSS	3,49e5	1,08e-4	0,311
1A7.gr.DANADA	CDR H2 NGDS→NADA CDR H1 DS→DA	3,87e5	2,15e-4	0,557

Para el anticuerpo 3C8.gr5, se identificaron las secuencias DT (en CDRH2) y DG (en CDR L2) (ambos sitios de isomerización potenciales) como residuos potencialmente inestables en el anticuerpo 3C8.gr.5. Se realizaron mutaciones en cada una de estas secuencias, como se muestra en la tabla 7.

5 **Tabla 7: Mutaciones introducidas en variantes de mab 3C8.gr.5**

Clon de anticuerpo	Cambio de secuencia (secuencia original → secuencia mutada)
3C8.gr.DA	CDR H2 DT→DA
3C8.gr.DQ	CDR H2 DT→DQ
3C8.gr.5.EG	CDR L2 DG→EG
3C8.gr.5.QG	CDR L2 DG→QG
3C8.gr.5.SG	CDR L2 DG→SG

10 La mutación de los residuos DT en CDR H2 a DA o bien DQ dio como resultado una pérdida de afinidad por OX40 humano (en comparación con la afinidad del anticuerpo original) (tabla 8). La mutación de los residuos DG en CDR L2 a EG, QG o bien SG no alteró significativamente la afinidad de unión (tabla 8).

**Tabla 8: Constantes cinéticas para variantes de estabilidad de 3C8 anti-OX40 que se unen a OX40 humano**

		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
3C8.gr.5		4,29e5	6,13e-4	1,43
3C8.gr.DA	CDR H2 DT→DA	3,88e5	5,02e-3	12,9
3C8.gr.DQ	CDR H2 DT→DQ	3,81e5	3,09e-3	8,12
3C8.gr.5.EG	CDR L2 DG→EG	5,80e5	5,69e-4	0,98
3C8.gr.5.QG	CDR L2 DG→QG	4,57e5	5,34e-4	1,17
3C8.gr.5.SG	CDR L2 DG→SG	4,50e5	6,82e-4	1,51

15 **Pruebas de estabilidad:** El anticuerpo 1A7.gr.1 se sometió a pruebas de estabilidad como se describe anteriormente, y las secuencias DS (D está en CDRH1) y NGDS (en CDRH2) fueron estables en condiciones de prueba de agresión térmica. Además, los residuos M y W (en CDR-H1, -H2 y -H3) no mostraron niveles inaceptables de oxidación durante las pruebas de agresión química.

20 El anticuerpo 3C8.gr.5 también se sometió a pruebas de estabilidad. Mientras que los residuos DT eran estables en condiciones de prueba térmica, los residuos DG (CDR-L2) no eran estables en condiciones de prueba térmica.

25 **Generación y caracterización de mutantes por barrido de alanina de anticuerpos frente a OX40:** Se generaron mutantes por barrido de alanina de 1A7.gr.1 y 3C8.gr.5, por ejemplo, para examinar el impacto de las mutaciones sobre la afinidad de unión. Además, se determinó el impacto de la afinidad de unión sobre la actividad del anticuerpo. Se generaron mutantes usando mutagénesis de Kunkel para cambiar los residuos de aminoácido en la tercera CDR de la cadena ligera y de la cadena pesada. Los anticuerpos variantes se expresaron de forma transitoria en células 293 y se sometieron a prueba mediante Biacore 3000 para determinar su unión a OX40 humano.

30 Los resultados de este experimento se muestran en la tabla 9. Las sustituciones con alanina en CDR 3 de la cadena pesada en las posiciones 96 (1A7.Ala.14), 97 (1A7.Ala.11), 98 (1A7.Ala.13), 99 (1A7.Ala.10) y 100 (1A7.Ala.9) mostraron una unión reducida a huOX40. Estos resultados sugieren que los residuos en las posiciones 96, 97, 98, 99 y 100 pueden ser importantes para la unión del anticuerpo a OX40. La caracterización funcional de los mutantes por barrido de Ala 1A7.Ala9, 1A7.Ala10, 1A7.Ala11, 1A7.Ala13 y 1A7.Ala14 en un ensayo de coestimulación de linfocitos T *in vitro* demostró que la afinidad de los anticuerpos frente a OX40 disminuida se correlacionaba con la capacidad reducida de los anticuerpos con respecto a la coestimulación de la actividad de proliferación de linfocitos T efectores.

35

**Tabla 9: Constantes cinéticas para variantes de barrido por alanina de 1A7.gr.1 anti-OX40 que se unen a OX40 humano (la alanina sustituida está subrayada)**

	LC-CDR 3	HC-CDR 3	KD (nM)
1A7.gr.1	QQGH <u>L</u> LPPT (SEQ ID NO: 7)	VLAPRWYFSV (SEQ ID NO: 209)	0,62
1A7.Ala.7	Q <u>A</u> GHTLPPT (SEQ ID NO: 28)	VLAPRWYFSV (SEQ ID NO: 209)	0,91
1A7.Ala.5	QQ <u>A</u> IITLPPT (SEQ ID NO: 26)	VLAPRWYFSV (SEQ ID NO: 209)	0,39
1A7.Ala.3	QQG <u>A</u> TLPPT (SEQ ID NO: 24)	VLAPRWYFSV (SEQ ID NO: 209)	~0,5
1A7.Ala.4	QQGH <u>A</u> LPPT (SEQ ID NO: 25)	VLAPRWYFSV (SEQ ID NO: 209)	0,67
1A7.Ala.2	QQGHT <u>A</u> PPT (SEQ ID NO: 23)	VLAPRWYFSV (SEQ ID NO: 209)	~0,5
1A7.Ala.6	QQGH <u>I</u> L <u>A</u> PI (SEQ ID NO: 27)	VLAPRWYFSV (SEQ ID NO: 209)	0,16
1A7.Ala.1	QQGHTLP <u>A</u> T (SEQ ID NO: 22)	VLAPRWYFSV (SEQ ID NO: 209)	~0,5
1A7.Ala.15	QQGHTI <u>L</u> PPT (SEQ ID NO: 7)	<u>A</u> LAPRWYFSV (SEQ ID NO: 196)	0,66
1A7.Ala.16	QQGHTLPPT (SEQ ID NO: 7)	<u>V</u> <u>A</u> APRWYFSV (SEQ ID NO: 201)	0,54
1A7.Ala.14	QQGHTLPPT (SEQ ID NO: 7)	V <u>L</u> <u>A</u> ARWYFSV (SEQ ID NO: 202)	6,88
1A7.Ala.11	QQGHTLPPT (SEQ ID NO: 7)	VLAP <u>A</u> WYFSV (SEQ ID NO: 203)	16,7
1A7.Ala.13	QQGHTLPPT (SEQ ID NO: 7)	VLAPR <u>A</u> YFSV (SEQ ID NO: 204)	Unión débil
1A7.Ala.10	QQGHTLPPT (SEQ ID NO: 7)	VLAPRW <u>A</u> FSV (SEQ ID NO: 205)	5,94
1A7.Ala.9	QQGHTLPPT (SEQ ID NO: 7)	VLAPRWY <u>A</u> SV (SEQ ID NO: 206)	5,32
1A7.Ala.12	QQGHTLPPT (SEQ ID NO: 7)	VLAPRWYF <u>A</u> V (SEQ ID NO: 207)	0,41
1A7.Ala.8	QQGHTLPPT (SEQ ID NO: 7)	VLAPRWYFS <u>A</u> (SEQ ID NO: 208)	0,41

- 5 El análisis de variantes de barrido por alanina del anticuerpo 3C8.gr5 se muestra en la tabla 10. Los anticuerpos variantes que comprendían sustituciones con alanina en CDR 3 de la cadena ligera y de la cadena pesada en las posiciones 91, 93, 94 y 95 mostraron una unión significativamente reducida a huOX40. Cuando se mutaron a alanina, las tres posiciones (95, 96 y 97) en CDR3 de la cadena pesada mostraron una unión reducida a huOX40.

**10 Tabla 10: Constantes cinéticas para variantes de barrido por alanina de 3C8.gr.5 anti-OX40 que se unen a OX40 humano (la sustitución con alanina está subrayada)**

	LC-CDR 3	HC-CDR 3	KD (nM)
3C8.gr.5	VHYA <u>Q</u> IPYT (SEQ ID NO: 42)	ARDRLDY (SEQ ID NO: 200)	1,28

3C8.A.1	<u>A</u> IIYAQFPYT (SEQ ID NO: 43)	ARDRLDY (SEQ ID NO: 200)	2,7
3C8.A.2	V <u>A</u> YAQFPYT (SEQ ID NO: 44)	ARDRLDY (SEQ ID NO: 200)	2,6
3C8.A.3	VII <u>A</u> QFPYT (SEQ ID NO: 45)	ARDRLDY (SEQ ID NO: 200)	>100
3C8.A.4	VHYA <u>A</u> FPYT (SEQ ID NO: 46)	ARDRLDY (SEQ ID NO: 200)	1,27
3C8.A.5	VHYAQ <u>A</u> PYT (SEQ ID NO: 47)	ARDRLDY (SEQ ID NO: 200)	27,9
3C8.A.6	VHYAQF <u>A</u> YT (SEQ ID NO: 48)	ARDRLDY (SEQ ID NO: 200)	>100
3C8.A.7	VIIYAQFP <u>A</u> T (SEQ ID NO: 49)	ARDRLDY (SEQ ID NO: 200)	unión débil
3C8.A.8	VIIYAQFPYT (SEQ ID NO: 42)	AR <u>A</u> RLDY (SEQ ID NO: 197)	sin unión
3C8.A.9	VIIYAQFPYT (SEQ ID NO: 42)	ARD <u>A</u> LDY (SEQ ID NO: 198)	32,5
3C8.A.10	VIIYAQFPYT (SEQ ID NO: 42)	ARDR <u>A</u> DY (SEQ ID NO: 199)	15,8

**Mab 1A7.gr.1 se unió con alta afinidad a OX40 humano, analizado usando análisis por radioinmunoanálisis:**

Se realizaron estudios de unión en equilibrio como se describe para determinar la afinidad de mab 1A7.gr.1 con respecto a OX40 humano expresado en células BT-474 transfectadas. Los valores de K<sub>d</sub> se resumen en la tabla 11. La afinidad de unión medida promedio fue de 0,45 nM (n=3, valores individuales de 0,43, 0,44, 0,49).

5

**Tabla 11 Análisis de unión en equilibrio de la unión de mab 1A7.gr.1 a células BT-474 que expresan OX40 humano recombinante**

Anticuerpo	Ensayo	K <sub>d</sub> (nM)	K <sub>d</sub> promedio (nM) (± DE)
	1	0,43	0,45 ± 0,03
1A7.gr.1	2	0,44	
	3	0,49	

10

**Mab 1A7.gr.1 se unió con alta afinidad a OX40 expresado en linfocitos T humanos, de macaco cangrejero, de rata y de ratón:**

Se evaluó la unión de mab 1A7.gr.1 a OX40 expresado en linfocitos T humanos, de macaco cangrejero, de rata y de ratón en un ensayo basado en citometría de flujo. Los valores de CE<sub>50</sub> promedio para la unión de mab 1A7.gr.1 a los linfocitos T humanos y de macaco cangrejero se resumen en la tabla 12 y las curvas de unión se muestran en la FIG. 2. Los resultados indican que mab1A7.gr.1 se unió a linfocitos T humanos y de macaco cangrejero con alta afinidad similar, con valores de CE<sub>50</sub> de 0,220 ± 0,026 (1,47 nM) y 0,142 ± 0,0001 µg/mf (0,946 nM) para linfocitos T humanos y de macaco cangrejero respectivamente. No se detectó ninguna unión medible de mab1A7.gr.1 a los linfocitos T de rata o ratón.

15

**Tabla 12: Unión de mab 1A7.gr.1 a linfocitos T humanos y de macaco cangrejero**

	Ensayo	CE <sub>50</sub> (µg/ml)	CE <sub>50</sub> promedio (µg/ml) (± DE)
Macaco cangrejero	1	0,143	0,142 ± 0,00014
	2	0,142	
Ser humano	1	0,196	0,220 ± 0,053
	2	0,184	
	3	0,201	
	4	0,298	

20

**El tratamiento con el anticuerpo agonista frente a OX40 mab1A7.gr.1 coestimuló la proliferación de linfocitos**

**T efectores y la producción de interferón gamma después del acoplamiento del receptor de linfocitos T de una manera dependiente de la dosis:** Se estimularon los linfocitos T de memoria CD4+ con una concentración fijada de anti-CD3 y una concentración variable de anti-OX40 o anticuerpos de control como se describe. En ausencia de reticulación de anti-CD3, mab 1A7.gr.1 no tuvo ningún efecto sobre la proliferación de linfocitos T (**FIG. 3A**). La concentración creciente de mab 1A7.gr.1 coestimuló la proliferación de linfocitos T de memoria CD4+ en respuesta a la reticulación de anti-CD3. La CE<sub>50</sub> calculada para el efecto coestimulador de mab1A7.gr.1 fue de 9,96 ng/ml (n=2, **FIG. 3A**). Las concentraciones crecientes de mab1A7.gr.1 coestimularon la producción de linfocitos T de memoria CD4+ de interferón gamma en respuesta a la reticulación de anti-CD3 (**FIG. 3B**). Estos resultados demostraron que el mab1A7.gr.1 frente a OX40 agonista coestimuló la proliferación de linfocitos T de memoria CD4+ y la producción de interferón gamma.

## MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS II

**1. Anticuerpos:** Se adquirieron los anticuerpos anti-OX40 humano purificado (PE) (clon ACT35), IgG1 de ratón (PE), anti-CD3 humano (clon SP34), anti-CD4 humano (FITC), anti-CD25 humano (PE), anti-CD45RA humano (APC), anti-CD3-APC humano y anti-CD11b humano de ratón purificado de BD biosciences. Se adquirió alemtuzumab (Campath) de Genzyme. Se adquirió anti-CD52 humano (APC) de Sigma. Se adquirió anti-IgG de ratón caprino-Alexa Fluor 647 de Invitrogen. Se adquirieron anti-CD127 humano (eFluor 450) y anti-OX40 de ratón de rata (PE, clon OX86) de eBiosciences. Se generaron anticuerpo anti-OX40 humano 1A7gr1, rituximab (anti-CD20 quimérico, IgG1) y anti glucoproteína D de VHS (anticuerpo anti-gD, IgG1 humana) en Genentech. Se adquirió anti-IgG humana (PE) de BD Biosciences. El kit II de aislamiento de CD4 humanos era de Miltenyi Biotech. Se adquirió el kit de aislamiento de NK humanos de Stern Cell Technology.

### 2. Células y medios

**a, Líneas celulares:** Se adquirió BT474 (una línea de células de cáncer de mama humano) de ATCC; se adquirió la línea celular anfitrión basada en 293 de Life Technology. Las células BT474 y anfitrónicas se cultivaron y mantuvieron en medio DMEM complementado con FBS al 10 %/pen/estrep en una incubadora a 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub>. Las células L que expresaban CD32a y CD80 se cultivaron y mantuvieron en el medio RPMI completo (RPMI-1640, complementado con FBS al 10 % (inactivado por calor)/pen/estrep/glutamina/aminoácidos no esenciales/βME 55 μM) en una incubadora a 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub>. U937 (una línea celular monocítica humana) se cultivó y mantuvo en el medio RPMI completo en una incubadora a 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub>.

**b, Generación de clones de BT474 que expresan OX40 humano:** Para generar el plásmido OX40 humano-MSCV (hOX40-MSCV), se clonó ADNc de OX40 humano como una proteína de fusión con una marca de glucoproteína D (gD) de VHS 5' en el vector retrovírico MSCV IRES GFP (Clontech). Se transfectaron células de empaquetamiento Phoenix anfitrónicas con plásmido hOX40-MSCV por medio de Eugene HD (Roche). Posteriormente se infectaron las células BT474 con sobrenadantes víricos de las células anfitrónicas transfectadas. Se enriquecieron grupos de células BT474 que expresaban OX40 clasificando células gD+ y GFP+ en superficie. Se generaron clones que expresaban OX40 por análisis de dilución limitante de los clones que expresaban OX40. Se seleccionaron clones que expresaban niveles altos y bajos de OX40 en base a la expresión en la superficie de la marca gD y los niveles de expresión de OX40 por citometría de flujo. Para determinar los niveles de expresión de OX40 humano en clones de BT474, se tiñeron células que expresaban OX40 con anti-OX40 humano-PE (clon ACT35, BD Biosciences), y se midió la fluorescencia celular en un FACS Canto II (BD Bioscience) y se analizó usando el programa informático Flowjo (TreeStar).

**c, Aislamiento de leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC), linfocitos T, monocitos y linfocitos NK humanos normales:** Se donaron muestras de sangre periférica humana normal por empleados de Genentech registrados y se proporcionaron por el Departamento del Servicio Sanitario de los Empleados (Employee Health Service). Se obtuvo la capa leucocítica humana normal del Banco de Sangre de San Francisco por medio del Departamento del Servicio Sanitario de los Empleados de Genentech. Se recuperaron glóbulos blancos periféricos (PBMC) de sangre completa humana usando un dispositivo de aféresis Trima Accel y se enriquecieron adicionalmente por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare).

Se aislaron linfocitos T CD4+ de PBMC usando un kit de aislamiento de linfocitos T CD4+ de Miltenyi. Se tiñeron linfocitos T indiferenciados CD4+ con CD4-FITC, CD25-PE y CD127-e450 (eBiosciences) para clasificar las células CD4+CD25-CD127+ y las células CD4+CD25+CD127-. Se clasificaron los linfocitos Treg del mismo donante con FACS Aria (BD Biosciences). Se confirmó la pureza de las células clasificadas por análisis de citometría de flujo inmediatamente después de la clasificación.

Se usaron los PBMC de las muestras de sangre completa aisladas por centrifugación en gradiente Ficoll-Paque para el aislamiento de monocitos. Se aislaron monocitos de PBMC usando un kit de aislamiento de monocitos humanos (Miltenyi). Se cultivaron monocitos aislados de 7 a 14 días con el medio RPMI completo en presencia de 20 ng/ml de GM-CSF para la generación de macrófagos derivados de monocitos (MDM).

Se aislaron linfocitos NK humanos normales de PBMC de la capa leucocítica usando el kit de enriquecimiento de

linfocitos NK humanos (Stern Cell Technology) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se usaron inmediatamente las células para el ensayo de ADCC.

**3. Reactivos de marcado celular:** Se marcaron linfocitos T indiferenciados CD4+ purificados con CFSE usando el CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit (Life Technology) y se marcaron los linfocitos Treg purificados con el PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma). Se usaron ambos kits de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**4. Ensayo de supresión por Treg:** Se irradiaron células L que expresaban CD32 y CD80 a 5000 rads y se emplearon como células presentadoras de antígeno para el ensayo de supresión de células CD4+CD25+CD127-.

Las células L CD32+ CD80+ irradiadas (5000 RAD, 10.000 células/pocillo) se sembraron en placa en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo plano, y se mantuvieron en una incubadora a 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub> durante la noche. Al día siguiente, se evaluó la proliferación de linfocitos T indiferenciados CD4+ en presencia o ausencia de linfocitos Treg clasificados en el siguiente ensayo de supresión de linfocitos T CD4+CD25+CD127-.

Para supervisar la proliferación de linfocitos T CD4+ indiferenciados, se añadieron 100.000 linfocitos T CD4+ indiferenciados marcados con CFSE (5 µm) a cada pocillo en la placa de ensayo, que ya contenía células L sembradas el día anterior. Para someter a prueba la función supresora de los linfocitos Treg, se añadieron 200.000 linfocitos Treg marcados con PKH26 (2 µm) a cada pocillo que contenía linfocitos T indiferenciados CD4+ marcados con CFSE. Para someter a prueba la actividad del anticuerpo anti-OX40 1A7.gr1, se añadió 1A7.gr1 o el anticuerpo control de isotipo anticuerpo anti-CD20 (rituximab) (cada uno a 200 ng/ml) al cultivo de linfocitos T CD4+ indiferenciados, linfocitos Treg y células L CD32<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup> irradiadas. Se añadió anti-CD3 soluble a las células a una concentración final de 2,5 ng/ml. La placa de ensayo se mantuvo en una incubadora a 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub> durante 6 días antes de la adquisición de los datos. En el día 6, se detectó la proliferación de linfocitos T CD4 indiferenciados por dilución de colorante en CFSE y se midió la fluorescencia celular en un FACS Canto II (BD Bioscience) y se analizó usando el programa informático FlowJo (TreeStar).

**5. Ensayo de fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP):** Se emplearon células U937 como células efectoras fagocíticas en el ensayo de ADCP. Se sembraron 50.000 células U937 marcadas con PKH26 (2 µm) en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos. Se añadieron cantidades variables de anticuerpos anti-OX40, 1A7.gr1, o anti-HER2 (control de isotipo trastuzumab) (diluciones en serie de 2 veces de 1000 a 7,8 ng/ml) a las células U937. Se utilizaron clones de BT474 de alta o bien de baja expresión de OX40 como células diana en el ensayo de ADCP. Se añadieron 5.000 células BT474 OX40+ a las células U937 en la placa de ensayo. La placa de ensayo se incubó en una incubadora a 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub> durante 4 horas. A continuación, se obtuvieron las células para la medición de fluorescencia celular en un FACS Canto II (BD Bioscience) y se analizaron usando el programa informático FlowJo (TreeStar). Se calculó el porcentaje de fagocitosis dividiendo los acontecimientos GFP+ PKH26+ (es decir, las células U937 medidas que han engullido a las células BT474) de todos los acontecimientos GFP+ (todas las células BT474).

**6. Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC):** Para demostrar que 1A7.gr1 inducía la ADCC de linfocitos T que expresaban OX40, se cocultivaron linfocitos NK primarios con linfocitos T CD4+ primarios activados. Se aislaron linfocitos T CD4+ y linfocitos NK del mismo donante de PBMC usando el kit de aislamiento de linfocitos T CD4 humanos (kit de Miltenyi) y el kit de enriquecimiento de linfocitos NK humanos (Stern Cell Technology), respectivamente. Se indujo la expresión de OX40 en linfocitos T CD4+ aislados activando los linfocitos T con PHA (5 µg/ml) durante 48 horas en medio RPMI-1640 completo. Se usó alemtuzumab (mAb anti-CD52) como control positivo y se usó anti-gD como control negativo para el ensayo de ADCC. Se incubaron células CD4+ activadas (5.000 por pocillo) con cantidades variables de 1A7.gr1 o anticuerpos de control (diluciones en serie de 3 veces de 10000 a 0,01 ng/ml) durante 30 minutos en una placa de ensayo de cultivo tisular de 96 pocillos. Posteriormente, se inició el ensayo de ADCC añadiendo linfocitos NK (50.000 células) a cada pocillo. A continuación, la placa de ensayo se incubó durante otras 20 horas en una incubadora a 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub>. A continuación, se tiñeron los cocultivos con anti-CD4-FITC humano y 7AAD (BD Biosciences). Después del lavado con PBS, se adquirieron los datos por citometría de flujo (BD FACScaliber) y se analizaron por el programa FlowJo (TreeStar). La frecuencia de destrucción (ADCC) de los linfocitos T CD4 que expresan OX40 se definió por el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup> frente a los linfocitos T CD4 totales.

Para demostrar que 1A7gr1 inducía la ADCC sensible a OX40, se sembraron clones de BT474 (línea de células de cáncer de mama humano) de alta o baja expresión de OX40 humano (5.000 por pocillo) en una placa de ensayo de cultivo tisular de 96 pocillos de paredes negras para permitir la unión y se mantuvieron durante 24 horas en una incubadora a 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub>. A continuación, se añadieron anticuerpo anti-CD20 (control de isotipo) o anticuerpo agonista anti-OX40 1A7.gr1 a las células BT474. Se aislaron linfocitos NK humanos primarios de donantes sanos de PBMC de la capa leucocítica usando el kit de enriquecimiento de linfocitos NK humanos (Stern Cell Technology), y, a continuación, se añadieron 50.000 linfocitos NK purificados a los pocillos que contenían clones de BT474 en presencia de anti-CD20 (control de isotipo rituximab) o 1A7.gr1. La placa de ensayo se incubó durante 24 horas antes de que se añadiera el reactivo de CellTiterGlo para capturar la señal quimioluminiscente. El porcentaje de células que se someten a ADCC mediada por anti-OX40 se calculó dividiendo la señal de las células tratadas con anticuerpo con la de las células no tratadas. Se resta la señal del único cultivo de NK para compensar la señal de fondo de los linfocitos NK.

## RESULTADOS II

**Mab 1A7.gr.1 inhibió la supresión por Treg de linfocitos T indiferenciados CD4+:** Probamos si la reticulación OX40 por la unión del anticuerpo agonista frente a OX40 a los linfocitos Treg inhibirá su capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos T indiferenciados. Se indujo la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> indiferenciados por reticulación de anti-CD3 en ausencia de 1A7.gr.1. La adición de linfocitos Treg a cultivos de linfocitos T indiferenciados suprimió la proliferación de linfocitos T indiferenciados inducida por anti-CD3. El tratamiento con mAb 1A7.gr.1 inhibió la función supresora de los linfocitos T reguladores (n=3, **FIG. 6**). Se midió la proliferación de linfocitos T indiferenciados supervisando las poblaciones de baja concentración de CFSE a través de análisis por citometría de flujo. Este resultado demostró que mAb 1A7.gr.1 inhibió la función supresora de los linfocitos Treg.

**Los clones transgénicos de BT474-hOX40 expresaron diferentes niveles de hOX40:** El nivel de expresión de OX40 humano se caracterizó en clones de células BT474 transgénicas usando tinción en superficie de hOX40 e intensidad fluorescente media (MIF) por análisis por citometría de flujo. El clon de alta expresión de BT474-OX40 humano expresó OX40 más de 5 veces más que el clon de baja expresión de BT474-OX40 humano, mostrando el clon de alta expresión de OX40 una MIF de 5243 (**FIG. 8B**) y mostrando el clon de baja expresión de OX40 una MIF de 994 (**FIG. 8A**). El anticuerpo control de isotipo, trastuzumab, tenía una MIF de 10 (datos no mostrados).

**El tratamiento con el anticuerpo agonista frente a OX40 indujo la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) dependiente de OX40:** Para determinar si mab anti-OX40 humano 1A7.gr.1 mediaba en ADCP, se cultivaron células mieloides U937 con células diana que expresaban OX40, clones de BT474 que expresaban altos o bajos niveles de OX40. El tratamiento con el anticuerpo agonista frente a OX40 1A7 indujo la fagocitosis de los clones de BT474-hOX40 que expresaban bajos y altos niveles de hOX40, de una manera dependiente de la dosis como se sometió a ensayo usando FACS (**FIG. 9**). Además, se observó un nivel mayor de fagocitosis usando el clon de alta expresión de BT474-hOX40 que cuando se usó el clon de baja expresión de BT474-hOX40, lo que sugiere que la fagocitosis mediada por células mediada por anticuerpos frente a OX40 era dependiente del nivel de expresión de OX40 en las células diana (**FIG. 9**). Por el contrario, trastuzumab (también denominado Herceptin), el anticuerpo control de isotipo, solo medió en un 10 % de la fagocitosis como se muestra con el clon de alta expresión de BT474-hOX40. Estos datos demostraron que mab 1A7.gr.1 inducía la fagocitosis de las células diana que expresaban OX40 y que los niveles de fagocitosis celular dependiente de anticuerpos se correlacionaban con los niveles de OX40.

**El tratamiento con el anticuerpo frente a OX40 agonista 1A7.gr.1 indujo la ADCC en clones de BT474 que expresaban OX40 humano, y el nivel de ADCC fue significativamente mayor en las células que expresaban altos niveles de OX40 frente al nivel de ADCC en células que expresaban bajos niveles de OX40:** El tratamiento con el anticuerpo agonista frente a OX40 1A7.gr.1 indujo la ADCC en células que expresaban OX40 (**FIG. 10**). Para detectar la ADCC, se realizó el ensayo CellTiterGlo. El tratamiento con el anticuerpo agonista anti-OX40 1A7.gr.1 a 0,1 ug/ml indujo una ADCC significativa de células de baja expresión de hOX40-BT474 como se evidencia por la viabilidad reducida de las células diana. El tratamiento con el anticuerpo agonista frente a OX40 1A7.gr.1 a 0,1 ug/ml dio como resultado una ADCC incluso más extensa de células de alta expresión de hOX40-BT474. La diferencia de ADCC entre los clones de baja y de alta expresión de hOX40-BT474 fue estadísticamente significativa ( $p=0,0077$ ). Por el contrario, el tratamiento con rituximab (control) no alteró la viabilidad tanto para los clones de BT474 de alta como de baja expresión de OX40. Estos datos demostraron que el anticuerpo frente a OX40 agonista 1A7.gr.1 pudo mediar en la destrucción de células que expresaban OX40 *in vitro*. Además, el nivel de ADCC fue significativamente mayor en las células que expresaban altos niveles de OX40 frente al nivel de ADCC en las células que expresaban bajos niveles de OX40. OX40 está altamente expresado en los linfocitos T intratumorales, y los linfocitos Treg intratumorales humanos expresan altos niveles de OX40 humano.

**La actividad del anticuerpo frente a OX40 agonista era dependiente de la reticulación y requería la función efectora por Fc para coestimular a los linfocitos T efectores:** Para determinar si mab 1A7 era dependiente de la reticulación del anticuerpo para coestimular la proliferación de linfocitos T efectores, se añadió mab 1A7.gr.1 al cultivo unido a placa o en forma soluble. Los resultados de este experimento se muestran en la **FIG. 4A**. En presencia de anti-CD3 unido a placa, mab 1A7.gr.1 unido a placa coestimuló la proliferación de linfocitos T efectores CD4<sup>+</sup>. Por el contrario, se anuló la actividad coestimuladora cuando se proporcionó 1A7 en forma soluble en presencia de anti-CD3 unido a placa, a un nivel similar al observado con un anticuerpo control de isotipo unido a placa en presencia de anti-CD3 unido a placa. Estos resultados sugieren que se puede requerir la reticulación (por ejemplo, proporcionada adhiriendo mab 1A7.gr.1 a la placa) para la coestimulación por mab 1A7 de los linfocitos T efectores.

Para averiguar además si mab 1A7.gr.1 requería la reticulación para su actividad, se generó un anticuerpo mutante para crear un anticuerpo que no se pudiera unir al receptor Fc gamma presentado en las células. En resumen, el residuo de asparagina en 297 de Fc, el sitio para la glucosilación con enlace N requerida para la unión a los receptores Fc gamma, se mutó a glicina (N297G) para prevenir que Fc de anticuerpo se uniera a los receptores Fc. Los resultados de este experimento se muestran en la **FIG. 4B**. El mAb 1A7 gr.1 (IgG1), que albergaba la mutación N297G, no coestimuló la proliferación de linfocitos Tef. Por el contrario, mab 1A7 gr.1 natural (no mutado) coestimuló la proliferación de linfocitos Tef inducida por anti-CD3. Conjuntamente con los resultados mostrados en la **FIG. 4A**, estos resultados demostraron que la actividad del mab 1A7 gr.1 agonista frente a OX40 era dependiente de la reticulación, lo que requería que la función efectora por Fc coestimulara a los linfocitos T efectores.



**Mab 1A7 gr.1-IgG1 poseía actividad de reticulación más potente que mab 1A7.gr.1-IgG4.** Los isotipos de anticuerpo tienen unión diferencial a los receptores Fc gamma. Para identificar el isotipo que permitía la actividad de coestimulación de linfocitos T efectores más potente, se comparó la actividad de mab 1A7.gr.1, que tenía una Fc de IgG1 humana, con la actividad de mab 1A7 gr.1 en una cadena principal de IgG4 humana. Los resultados de este experimento se muestran en la **FIG. 5**. Mab 1A7 gr.1-IgG1 coestimuló la proliferación de linfocitos T efectores inducida por anti-CD3 de forma más potente que mab 1A7 gr.1-IgG4. Este resultado indicaba que mab1A7 gr.1, que comprendía una Fc de IgG1 humana, poseía una actividad de reticulación más potente que mab 1A7.gr.1, que comprendía una Fc de IgG4 humana.

**El tratamiento con mab 1A7.gr.1 indujo la ADCC de linfocitos T que expresaban OX40.** Los anticuerpos que reconocen los antígenos de superficie celular tienen el potencial de mediar en la disminución de las células diana a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Para determinar si mab1A7.gr1 inducía la ADCC, se generaron células diana que expresaban altos niveles de OX40 estimulando los linfocitos T CD4+ de sangre periférica con PHA y se pusieron en contacto con mab 1A7.gr.1 en presencia de células efectoras humanas. Los resultados de este experimento se muestran en la **FIG. 7A**. El tratamiento con mab 1A7.gr.1 indujo la ADCC de linfocitos T que expresaban OX40 cuando los linfocitos NK se cultivaron con linfocitos T CD4+ estimulados (a una proporción de 10 linfocitos NK: 1 linfocito T activado). Este resultado demostró que 1A7.gr1 inducía la ADCC en linfocitos T que expresaban altos niveles de OX40. La disminución inducida por mab 1A7.gr.1 fue menos extensa que la inducida por el tratamiento con el anticuerpo de control positivo, alemtuzumab (mab anti-CD52). Por el contrario, el tratamiento con el mab de control negativo anti-gD (control de isotipo) no dio como resultado la inducción de ADCC.

Para determinar si los anticuerpos mab 1A7.gr.1 con diferentes isotipos de Fc demostraban actividad ADCC diferencial *in vitro*, se comparó la actividad de mab 1A7.gr1 con el isotipo IgG1 con la actividad de mab 1A7.gr1 con el isotipo IgG4. Los resultados de este experimento se muestran en la **FIG. 7B**. El tratamiento con mab A7.gr1 (IgG1) indujo una mayor ADCC de linfocitos T CD4+ que expresaban OX40 en comparación con el nivel de ADCC inducida por mab 1A7.gr1 (IgG4).

### MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS III

**Ensayo de competencia de unión de OX40L y anti-OX40.** El anticuerpo anti-OX40 humano 1A7gr1 se conjugó a Alexa Fluor647. Se generaron proteínas OX40L humano-flag y DR5 humano-flag en Genentech. Se adquirió el anticuerpo anti-flag conjugado a Alexa Fluor 555 de Cell Signaling (n.º de cat 3768). Las células Hut78-hOX40 (Hut78-hOX40, una línea de linfocitos T humanos, transducida de forma retroviral para la expresión de OX40 humano) transgénicas se cultivaron y mantuvieron en el medio RPMI completo (RPMI-1640, complementado con FBS al 10 % (inactivado por calor)/pen/estrep/glutamina/aminoácidos no esenciales/(βME) 55 uM en una incubadora a 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub>.

En primer lugar, se realizó una valoración de la unión de mab 1A7gr1 a OX40. Se usaron 1x10<sup>6</sup> células Hut78-hOX40 y se valoró 2 veces la concentración de mab1A7gr1 comenzando a partir de 10 ug/ml. Después de 30 min de incubación a 4 °C, se lavaron dos veces las células en tampón de lavado (PBS/FBS al 0,5 %/EDTA 2 mM), seguido de la adquisición de los datos en el citómetro de flujo FACSCantoll (BD). A continuación, se analizaron los datos por el programa Flowjo (TreeStar) y se capturó la intensidad fluorescente media (MIF). Se eligió la cantidad de mab 1A7.gr.1 (200 ng/ml) que generó alrededor de un 70 % de la MIF máxima para su uso en el ensayo de competencia. Se llevó a cabo una valoración de la unión OX40L-flag de una forma similar, excepto porque se valoró 3 veces OX40L-flag comenzando a partir de 10 ug/ml.

El ensayo de competencia de unión de OX40L y mab anti-OX40 se realizó como sigue: se añadió OX40L-flag o DR5-flag de control a concentraciones de 10 ug/ml a 10 ng/ml a 1x10<sup>6</sup> células Hut78-hOX40. Después de 30 min de incubación a 4 °C, se lavaron dos veces las células en tampón de lavado, y, a continuación, se añadieron 10 ug/ml de anti-flag-Alexa Fluor 555 y se añadieron 200 ng/ml de mab 1A7.gr.1-AlexaFluor647 para someter a prueba la competencia entre OX40L y mab anti-hOX40 1A7.gr.1. Después de 30 min de incubación a 4 °C, se lavaron dos veces las células en tampón de lavado, seguido de la adquisición de los datos en el citómetro de flujo FACSCantoll (BD). A continuación, se analizaron los datos por el programa Flowjo (TreeStar) para capturar la MIF de unión a 1A7gr1.

### RESULTADOS III

El experimento de valoración demostró que el mab anti-OX40 humano 1A7gr1 se unía a células Hut78-hOX40 de una forma dependiente de la dosis, con un 70 % de unión máxima observada a aproximadamente 200 ng/ml de anticuerpo (**FIG. 12A**). Se eligió esta concentración para experimentos de competencia. OX40L-flag también demostró una unión dependiente de la dosis a células Hut78-hOX40 (**FIG. 12B**).

En el ensayo de competencia, la unión de mab anti-OX40 humano 1A7.gr.1 a células Hut78-hOX40 disminuyó a medida que se incrementaba la concentración de OX40L-flag (**FIG. 12C**). Por el contrario, la presencia de DR5-flag de control no tuvo ningún impacto sobre la unión a mab 1A7.gr.1 (**FIG. 12D**), lo que indica que la unión de OX40L a las células Hut78-OX40 era específica. Estos datos demostraron que OX40L compite con mab anti-OX40 humano

1A7gr1 por su unión a hOX40 en células Hut78-OX40. En experimentos similares, también se observó que 3C8.gr5 competía por la unión con OX40L.

#### MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS IV

**Evaluación farmacocinética (FC) de anti-OX40 en ratones.** A los ratones B6.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/SzJ hembra (n=12 animales/grupo) se les administró una única inyección i.v. de 1A7.gr1-IgG1 (MOXR0916) a 1 mg/kg o 10 mg/kg el día 0. A cada ratón se le administró un volumen de dosis de 5 ml/kg (la dosis de 1 mg/kg estaba a una concentración de 0,2 mg/ml; la dosis de 10 mg/kg estaba a una concentración de 2 mg/ml). Se extrajeron muestras de sangre (125-150 µl) de cada animal por medio de punción cardíaca (3 puntos de tiempo por animal; 3 animales por punto de tiempo) a los 5 minutos; 1, 3, 8 y 24 horas; y 2, 4, 7, 10, 14, 21 y 28 días después de la dosis. No se extrajo ninguna muestra previa a la dosis para el estudio. Las muestras se extrajeron en tubos que contenían tubos separadores de suero y se procesaron como se describe a continuación.

Se dejó que las muestras coagularan a temperatura ambiente durante al menos 20 minutos antes de la centrifugación. La centrifugación comenzó tras 1 hora de la extracción a una fuerza centrífuga relativa de 11.000 revoluciones por minuto durante 5 minutos en una centrifugadora configurada para mantener 2 °C-8 °C. Se transfirió el suero separado de la sangre a tubos de 0,5 ml premarcados con tapas. Se almacenaron las muestras en un congelador configurado para mantener -80 °C hasta el análisis.

Se analizó 1A7.gr1-IgG1 con un ELISA genérico usando anti-IgG humana ovino como el reactivo de captura y anti-IgG humana caprino-peroxidasa de rábano picante (HRP) como el reactivo de detección. El límite de detección (LDD) eficaz para este ensayo fue de 0,08 µg/ml.

Se analizaron los datos de concentración de suero frente al tiempo de cada animal usando el modelo de entrada de inyección i.v. rápida y muestreo disperso (Model 201), WinNonlin Pro, versión 5.2.1, (Pharsight Corporation; Mountain View, CA). Todo el análisis FC se basó en un grupo sin exposición previa de datos de animales individuales. Se usaron los siguientes procedimientos para estimar parámetros FC específicos:  $C_{máx}$  (concentración máxima),  $ABC_{última}$  (se calculó el área bajo la curva de concentración de suero frente al tiempo desde el tiempo = 0 al momento de la última concentración medible usando la regla trapezoidal lineal),  $ABC_{inf}$  (área bajo la curva de concentración de suero frente al tiempo extrapolada al infinito),  $C_{máx}/D$  ( $C_{máx}$  normalizada a la dosis),  $ABC_{inf}/D$  ( $ABC_{inf}$  normalizada a la dosis),  $EL$  (eliminación;  $dosis/ABC_{inf}$ ),  $V_e$  (volumen de distribución en estado estacionario) y  $t_{1/2}$ ,  $\lambda_z$  (semivida terminal).

#### RESULTADOS IV

Después de la administración de 1 y 10 mg/kg, se observó que la FC era proporcional a la dosis para 1A7.gr1-IgG1 (FIG. 13). Los parámetros FC se resumen en la tabla 13 a continuación.

**Tabla 13: Parámetros FC**

Parámetro	Estimación	Error estándar
EL (ml/kg/día)	6,1	0,2
Vc (ml/kg)	54,5	2,2
Vp (ml/kg)	76,4	4,5
ELD (ml/kg/día)	188	26,8

Se observó una FC proporcional a la dosis lineal para 1A7.gr1 en ratones SCID no portadores de tumores. Estos datos sugieren que la farmacocinética de 1A7.gr1-IgG1 a los niveles de dosis sometidos a prueba fue como se esperaba para un anticuerpo monoclonal IgG1 humano no reactivo de forma cruzada en ratones y similar a la de los anticuerpos monoclonales IgG1 típicos.

#### MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS V

**Estudio de toxicidad piloto de 4 semanas en macacos cangrejeros.** Se administró por vía intravenosa el vehículo (acetato de histidina 10 mM, sacarosa al 6 %, Tween 20 al 0,02 %, pH 5,8) o 1A7.gr1-IgG1 a 0,01, 0,3 o 10 mg/kg/dosis en macacos cangrejeros macho. La pauta posológica fue una vez cada 2 semanas para tres dosis (administradas los días 1, 15 y 29). Se realizó la autopsia terminal tres días después de la última dosis. Los criterios de valoración de seguridad incluyeron: observaciones clínicas y diarias, análisis clínicos, coagulación, análisis de orina, análisis macroscópico y microscópico, toxicocinética (TC) y valores de anticuerpos antiterapéuticos (ATA). Los análisis farmacodinámicos (FD) incluyeron citocinas en suero, activación/proliferación/disminución de linfocitos T y ocupación del receptor OX40.

Se extrajo sangre por venopunción. Se obtuvieron muestras de sangre adicionales (por ejemplo, debido a la coagulación de las muestras distintas de suero) cuando no se superaba la frecuencia de muestreo y el volumen de

sangre permitidos. Cuando se extrajeron al mismo tiempo otros tipos de muestras que las muestras de FACS y FD, esas muestras se extrajeron en primer lugar después de la venopunción, seguido de muestras de FACS y FD. Se recogió orina por drenaje de bandejas de acero inoxidable especiales. Después de su recogida, se transfirieron las muestras al laboratorio apropiado para su procesamiento. Se procesaron muestras de sangre en cuanto al suero y se analizó el suero en cuanto a diversos parámetros de bioquímica clínica.

Se analizaron los valores de bioquímica clínica individuales con un analizador OLYMPUS® au640e. Se midió la proteína C-reactiva (CRP) por inmunoturbidimetría.

Se extrajeron muestras de sangre con anticoagulante K2-EDTA para el análisis de citocinas en los puntos de tiempo indicados. Después de la centrifugación, se recogió el plasma y se almacenó a -80 °C hasta el análisis. Se determinaron los niveles de citocinas usando la tecnología de ensayo LUMINEX® xMAP® (Luminex, Austin, TX), una tecnología de multiplexación basada en microesferas que posibilita la cuantificación simultánea de múltiples citocinas. Se analizaron las muestras usando el MILLIPLEX® MAP Non-Human Primate Cytokine Magnetic Bead Panel Kit (EMD Millipore, Billerica, MA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El patrón contenía una mezcla de GCSF, GMCSF, IFN $\gamma$ , IL1beta, IL1ra, IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12/23p40, IL13, IL15, IL17A, IL18, MCP1, MIP1-alfa, MIP1-beta, sCD40, TGF-alfa, TNF-alfa y VEGF recombinantes. Los intervalos de la curva patrón fueron 4,6-3000 pg/ml para IL4; 11,6-7500 pg/ml para IL10 e IL18; y 2,3-1500 pg/ml para todas las demás citocinas. Las muestras de plasma se diluyeron 1:3 seguido de tres diluciones 1:2 en serie en placas de 96 pocillos, y se añadió una mezcla de microesferas fluorescentes conjugadas a anticuerpo específicas para cada citocina. Se incubaron las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de una incubación durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se añadió una mezcla de anticuerpos de detección biotinilados a las muestras, y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de una incubación de 30 minutos con estreptavidina-ficoeritrina. A continuación, se evaluaron las señales de fluorescencia usando un instrumento LUMINEX® FLEXMAP 3D®, con la intensidad de la señal de ficoeritrina correspondiente a la cantidad de citocina presente. Se determinaron las concentraciones de citocinas en suero a partir de ajustes de cinco parámetros de las curvas patrón para cada proteína.

Se analizó la concentración de 1A7.gr1-IgG1 en suero de mono usando un ELISA genérico. Se usó anti-IgG humana ovino (H+L) (absorbido por mono) como el reactivo de captura y se usó anti-IgG humana caprino (H+L) (absorbido por mono) conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) como el reactivo de detección.

Se extrajeron muestras de sangre durante todo el estudio para los análisis de ocupación del receptor usando citometría de flujo. Para el ensayo de citometría de flujo de tinción de marcadores de superficie (por ejemplo, receptor OX40), se prepararon mezclas de anticuerpos para cada panel de tinción en cada día del estudio. Se distribuyó una alícuota apropiada de la mezcla en los pocillos designados de una placa de 96 pocillos profundos. Para cada animal, se transfirieron 100  $\mu$ l de muestra de sangre completa y se mezclaron en los pocillos apropiados que contenían la mezcla de tinción. Se incubó la sangre teñida en la oscuridad a temperatura ambiente durante un mínimo de 30 minutos. Se lisaron los glóbulos rojos con 1,8 ml de 1X BD FACS Lyse (BD Biosciences) durante al menos 6 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se aspiró y se desechó. Se lavaron dos veces los sedimentos celulares con 1,8 ml de HBSS. Después del segundo lavado, se resuspendió cada muestra en 300  $\mu$ l de paraformaldehído al 1 %. Se transfirió (200  $\mu$ l) cada muestra a los pocillos apropiados de una placa de fondo en U de 96 pocillos para su adquisición en un citómetro de flujo BD FACS Canto II. Se realizó el análisis de los datos usando el programa informático FACS Diva (BD Biosciences). Se identificaron los linfocitos en base a su perfil DF/DL y los linfocitos T se seleccionaron como CD3+/DL<sup>baja</sup>. Posteriormente, se usó la selección jerárquica de los linfocitos T CD3+ para identificar y enumerar cada uno de los subconjuntos de linfocitos T. Se evaluó la ocupación de OX40 en linfocitos Th CD3+CD4+CD8- usando un artículo de prueba marcado de forma fluorescente (anticuerpo anti-OX40) que no se une a OX40 en presencia del artículo de prueba administrado. Se usó un anticuerpo IgG1 humanizado no relacionado como control de isotipo para 1A7.gr1. La fracción de linfocitos Th que fueron positivos por encima de la selección de isotipo se clasificó como % de células OX40+.

El diseño del estudio se resume en la tabla 14 a continuación.

**Tabla 14: Diseño del estudio de toxicidad piloto.**

Grupo	N.º de macacos cangrejeros macho	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	C <sub>máx</sub> proyectada (% de ocupación)	C <sub>mínima</sub> proyectada (% de ocupación)
1	4	Vehículo	0	--	--
2	4	1A7.gr1	0,01	0,2 $\mu$ g/ml (80 %)	0,05 $\mu$ g/ml (50 %)
3	4		0,3	6 $\mu$ g/ml (99 %)	1,5 $\mu$ g/ml (96 %)
4	4		10	200 $\mu$ g/ml (100 %)	60 $\mu$ g/ml (100 %)

**Estudio de toxicidad según las buenas prácticas de laboratorio (BPL).** Se administró el vehículo (acetato de histidina 20 mM, sacarosa 240 mM, polisorbato 20 al 0,02 %, pH 5,5) o 1A7.gr1-IgG1 por medio de inyección intravenosa rápida a 0,5, 5 o 30 mg/kg/dosis en macacos cangrejeros macho y hembra (cinco machos y cinco hembras por grupo). La pauta posológica fue una vez cada 2 semanas durante seis semanas, para un total de cuatro dosis (administradas los días 1, 15, 29 y 43). Se diseñaron los principales animales de estudio para la autopsia terminal en el día 45. Los animales designados para la autopsia de recuperación se sometieron a 6 semanas de recuperación después de la última dosis y se les realizó la autopsia el día 85. Los criterios de valoración de seguridad incluyeron: observaciones clínicas y diarias, análisis clínicos, coagulación, análisis de orina, análisis macroscópico y microscópico, toxicocinética (TC), valores de anticuerpos antiterapéuticos (ATA), farmacología de seguridad CV y evaluaciones neurológicas. Los análisis farmacodinámicos (FD) incluyeron citocinas en suero, activación/proliferación/disminución de linfocitos T y ocupación del receptor OX40 (periférica y tisular).

Se extrajo sangre por venopunción. Se recogió orina del/por drenaje de bandejas de acero inoxidable especiales durante la noche en hielo húmedo antes de la extracción de sangre. Después de su recogida, se transfirieron las muestras al laboratorio apropiado para su procesamiento. Se hizo ayunar a los animales antes de las extracciones de sangre para la bioquímica clínica.

Se analizó la concentración de 1A7.gr1-IgG1 en suero de mono usando un ELISA genérico.

Se evaluó la ocupación del receptor por evaluación de la unión de 1A7.gr1 marcado con AF647 en linfocitos T cooperadores CD3+CD4+ por citometría de flujo. En resumen, se añadieron 100 µl de sangre completa o suspensiones de células individuales a los pocillos apropiados de una placa de 96 pocillos de 2,2 ml/pocillo junto con 1,8 ml de Pharm Lyse recién preparada. Se mezclaron bien las muestras y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la lisis, se centrifugaron las muestras, se desecharon los sobrenadantes y se lavaron una vez las muestras con 1,8 ml de HBSS. Después del lavado, se bloquearon las células en 100 µl de suero de macaco cangrejero al 10 % y se incubaron durante un mínimo de 15 minutos en la oscuridad en un refrigerador configurado para mantener 2-8 °C. Después de la etapa de bloqueo, se añadieron los volúmenes apropiados de mezcla de anticuerpos a los pocillos apropiados en la placa, se mezcló la placa y, a continuación, se incubó durante un mínimo de 30 minutos en la oscuridad en un refrigerador configurado para mantener 2-8 °C. Después de su incubación, se lavó dos veces la placa con 1,8 ml de HBSS y se resuspendieron las muestras en 300 µl de paraformaldehído al 1 % y se incubaron durante 10-15 minutos en la oscuridad en un refrigerador configurado para mantener 2-8 °C. Después de la incubación, se transfirieron 200 µl de cada muestra a una placa de fondo en V de 96 pocillos y se analizaron en el citómetro. El instrumento de citometría de flujo proporcionó datos sobre la abundancia relativa de los diversos tipos de células con los antígenos marcadores. Se analizaron las muestras utilizando el citómetro de flujo FACSCanto™ II y el programa informático DIVA® 6.0. Los datos generados para cada animal en cada punto de tiempo posterior a la dosis se compararon con el valor del estudio previo correspondiente, así como con el intervalo de valores de control. La magnitud del incremento o disminución se evaluó de forma secundaria para determinar la potencial trascendencia biológica de cualquier cambio observado.

Se midieron los niveles de MCP-1 por procedimientos basados en LUMINEX® validados. El inmunoanálisis de tipo sándwich múltiple basado en microesferas es un ensayo de proteínas en fase sólida que usa microesferas codificadas espectralmente conjugadas a anticuerpos de captura específicos de analito como soporte sólido. Se añadieron patrones y muestras a los pocillos, y el analito (citocina) presente se unió al anticuerpo de captura específico conjugado a una microesfera codificada por color (cada microesfera de color es específica para 1 citocina). El sistema de detección en el ensayo fue estreptavidina conjugada a la proteína fluorescente, R-ficoeritrina o estreptavidina-ficoeritrina (estreptavidina-RPE) mezcladas con anticuerpos de detección biotinilados específicos de analito. Se extrajeron los contenidos de cada pocillo de microplaca en el instrumento Luminex. Supervisando las propiedades espectrales de las microesferas y la cantidad de fluorescencia de RPE asociada, se determinaron simultáneamente las concentraciones de varios analitos. Se centrifugaron las muestras para obtener restos de sedimentos celulares. Se lavaron los pocillos de una placa de filtro Multiscreen de 96 pocillos con 200 µl de tampón de lavado. A continuación, se transfirieron (25 µl) los patrones, las muestras de control de calidad (CC) y las muestras a los pocillos apropiados que contenían 25 µl de tampón de ensayo y se siguió de la adición de 25 µl de la solución de trabajo con anticuerpo-microesferas apropiada. Se incubó la placa en la oscuridad a temperatura ambiente en un agitador de placas configurado para agitar vigorosamente durante 2 horas (± 5 minutos), a continuación, se lavó dos veces con 200 µl de tampón de lavado, seguido de la adición de 25 µl de anticuerpos de detección a cada pocillo. Se incubó la placa en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora (± 2 minutos) en un agitador de placas configurado para agitar vigorosamente. A continuación, se añadieron 25 µl de solución de trabajo de estreptavidina-RPE de trabajo a cada pocillo y se incubó la placa en la oscuridad a temperatura ambiente, durante 30 minutos (± 1 minuto) en un agitador de placas configurado para agitar vigorosamente. Después de que se lavara dos veces la placa con 200 µl de tampón de lavado, se añadieron 150 µl de líquido envolvente a cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos en la oscuridad, en un agitador de placas configurado para agitar vigorosamente. La placa se leyó en el sistema Luminex. Se prepararon patrones de MCP-1 de mono en diluyente de ensayo que cubría el intervalo de concentración de 37,500 a 6000 pg/ml. Los LIDC y LSDC del ensayo fueron de 75,00 a 6000 pg/ml. Se prepararon muestras de CC de MCP-1 de mono en diluyente de ensayo a concentraciones teóricas de 200, 1000 y 3200 pg/ml. Además, se sembró en placa sin diluir un QC endógeno (CCE) y estaba en el intervalo de la curva.

El diseño del estudio se resume en la tabla 15 a continuación.

**Tabla 15: Diseño del estudio de toxicidad según BPL.**

Grupo	N.º de macacos cangrejeros	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	N.º de animales para la autopsia terminal (día 45)	N.º de animales para la autopsia de recuperación (día 85)
1	5F/5M	Vehículo	0	3F/3M	2F/2M
2	5F/5M	1A7.gr1	0,5	3F/3M	2F/2M
3	5F/5M		5	3F/3M	2F/2M
4	5F/5M		30	3F/3M	2F/2M

5

## RESULTADOS V

### *Estudio de toxicidad piloto*

10 El objetivo de este estudio fue evaluar la toxicidad, el perfil toxicocinético y la farmacodinámica de anti-OX40 (1A7.gr1-IgG1) cuando se administraba por medio de inyección intravenosa a macacos cangrejeros una vez cada 2 semanas (días 1, 15 y 29) para un total de 3 dosis.

15 La administración intravenosa de 1A7.gr1-IgG1 se toleró bien en macacos cangrejeros hasta 10 mg/kg una vez cada 2 semanas durante 4 semanas, y todos los animales sobrevivieron hasta la autopsia programada. Se observaron incrementos mínimos de la proteína C-reactiva (CRP) (**FIGS. 14A y B**), con incrementos transitorios de la CRP limitados a tres monos ATA+ principalmente en el grupo de alta dosis (10 mg/kg). De forma similar, los incrementos transitorios de un subconjunto mixto de citocinas (**FIGS. 15A y B**) se limitaron a los tres monos ATA+ principalmente en el grupo de alta dosis (10 mg/kg). No se observó ningún cambio en los análisis clínicos o elevaciones de citocinas en los animales ATA+ o ATA- restantes. No se observó ningún incremento de IFN $\gamma$ , como se esperaba en ausencia de exposición a antígeno.

20

25 Se confirmó la exposición en todos los animales por mediciones de FC en suero (**FIG. 16A**) y ocupación periférica del receptor (**FIG. 16B**). El primer ciclo de dosis para  $C_{m\acute{a}x}$  fue proporcional para los tres grupos. FC fue como se esperaba para un anticuerpo IgG1 en base a  $ABC_{0-14}$  a 10 mg/kg. Se observó una alta frecuencia de ATA: 3 de cada 4 animales en grupos de 0,01 y 0,3 mg/kg; y 2 de cada 4 animales en el grupo de 10 mg/kg. El impacto fue la concentración de suero y ocupación del receptor disminuidas. Estos resultados demuestran que la administración i.v. de 1A7.gr1 se toleró bien en macacos cangrejeros en la pauta de dosificación indicada.

30

### *Estudio de toxicidad según BPL*

El objetivo del estudio de toxicidad según BPL fue determinar la toxicidad de 1A7.gr1 en macacos cangrejeros dosificado por vía intravenosa a 0, 0,5, 5 y 30 mg/kg/dosis en los días del estudio 1, 15, 29 y 43, seguido de 42 días sin dosificación (periodo de recuperación).

35

La administración intravenosa de 1A7.gr1-IgG1 se toleró bien en macacos cangrejeros hasta 30 mg/kg una vez cada 2 semanas durante 6 semanas, y todos los animales sobrevivieron hasta los puntos de tiempo de la autopsia programada en los días del estudio 45 y 85. Se observó la FC proporcional a la dosis esperada para un anticuerpo IgG1 (**FIG. 17**). La exposición y la ocupación del receptor se mantuvieron en el nivel de dosis de 30 mg/kg (**FIG. 18**). Se detectaron ATA en todos los animales en los niveles de dosis de 0,5 y 5 mg/kg, pero no en el nivel de dosis de 30 mg/kg, con pérdida de exposición y ocupación del receptor. Se observó la elevación transitoria de MCP-1 en animales de dosis media (**FIG. 19**). No se observó ninguna activación o proliferación significativa de linfocitos T periféricos (**FIG. 20**), ni tampoco se observó ninguna reducción significativa en los recuentos de T periféricos absolutos.

40

45 En resumen, no se observó ninguna observación clínica o cambio en los parámetros de análisis clínico después de la primera dosis. Se observaron reacciones agudas posteriores a la dosis e incrementos transitorios de las proteínas y citocinas en fase aguda que comenzaron después de la 2.<sup>a</sup> dosis, potencialmente debido a ATA (consecuente en ambos estudios). No se advirtió ningún cambio en el peso de los órganos relacionados con el fármaco, hallazgo macroscópico o microscópico. Se detectaron ATA en todos los animales en los grupos de dosis de 0,5 mg/kg y 5 mg/kg (pero no en 30 mg/kg), con pérdida de exposición y ocupación del receptor. Se descubrió que 1A7.gr1 se unía a OX40 humano con alta afinidad ( $\sim 0,45$  nM) y FC era como se esperaba para una IgG1 típica y proporcional a la dosis. Estos se proyectan a un ser humano con  $EL=2,5$  ml/d/kg y  $t_{1/2}\sim 3$  semanas. No se observó ningún efecto FD significativo en el número de linfocitos T o el estado de activación en los tejidos o en la periferia. La carencia de activación o proliferación significativa de linfocitos T periféricos y la carencia de cambios significativos en los recuentos de linfocitos T periféricos absolutos no fue sorprendente, puesto que OX40 se expresa de forma transitoria solo en linfocitos T activados y los macacos cangrejeros sanos tendrán linfocitos T activados insignificantes.

50

55

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Genentech, Inc.  
 F. HOFFMANN-LA ROCHE AG  
 DU, Changchun  
 5 KIM, Jeong  
 ZHU, Jing  
 BEVERS III, Jack  
 WALSH, Kevin  
 DE ALMEIDA, Patricia  
 10 ANDYA, James  
 SHEN, Ye
  
  - <120> ANTICUERPOS ANTI-OX40 Y PROCEDIMIENTOS DE USO
  
  - <130> 146392029140
  
  - <140> Aún sin asignar
  - 15 <141> Simultáneamente con el presente documento
  
  - <150> US 61/973.193
  - <151> 31-03-2014
  
  - <150> US 61/989.448
  - <151> 06-05-2014
  
  - 20 <150> US 62/073.873
  - <151> 31-10-2014
  
  - <150> US 62/080.171
  - <151> 14-11-2014
  
  - <160> 209
  
  - 25 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
  
  - <210> 1
  - <211> 249
  - <212> PRT
  - <213> Homo sapiens
  
  - 30 <400> 1
- ```

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

**Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala**  
 100 105 110  
**Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln**  
 115 120 125  
**Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro**  
 130 135 140  
**Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr**  
 145 150 155 160  
**Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr**  
 165 170 175  
**Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly**  
 180 185 190  
**Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala**  
 195 200 205  
**Leu Tyr Leu Leu Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys**  
 210 215 220  
**Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala**  
 225 230 235 240  
**Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile**  
 245

<210> 2  
 <211> 5  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 2  
**Asp Ser Tyr Met Ser**  
 1 5

10

<210> 3  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 3  
**Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg**  
 1 5 10 15  
**Glu**

20

<210> 4  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

25

<400> 4  
**Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val**  
 1 5

<210> 5

<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 5  
**Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn**  
 1 5 10  
  
 <210> 6  
 <211> 7  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 6  
**Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser**  
 1 5  
 15  
  
 <210> 7  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 7  
**Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro Thr**  
 1 5  
  
 <210> 8  
 25 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 30 <400> 8  
**Asp Ala Tyr Met Ser**  
 1 5  
  
 <210> 9  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 9



**Glu Ser Tyr Met Ser**  
**1 5**

<210> 10  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 10  
**Asp Met Tyr Pro Asp Asn Ala Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg**  
**1 5 10 15**  
**Glu**

10 <210> 11  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Construcción sintética

<400> 11  
**Asp Met Tyr Pro Asp Asn Ala Asp Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg**  
**1 5 10 15**  
**Glu**

<210> 12  
 <211> 17  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 12  
**Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg**  
**1 5 10 15**  
 25 **Glu**

<210> 13  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 30 <223> Construcción sintética

<400> 13  
**Asp Met Tyr Pro Asp Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg**  
**1 5 10 15**  
**Glu**

<210> 14  
 35 <211> 17  
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 14

**Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Ser Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg**

**1 5 10 15**

5 **Glu**

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 15

**Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Ala**

**1 5**

15 <210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20 <400> 16

**Ala Pro Arg Trp Tyr Ala Ser Val**

**1 5**

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 17

**Ala Pro Arg Trp Ala Phe Ser Val**

**1 5**

30 <210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Construcción sintética

<400> 18

**Ala Pro Ala Trp Tyr Phe Ser Val**

**1 5**

<210> 19  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 19  
**Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ala Val**  
**1 5**

10 <210> 20  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

15 <400> 20  
**Ala Pro Arg Ala Tyr Phe Ser Val**  
**1 5**

20 <210> 21  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 21  
**Ala Ala Arg Trp Tyr Phe Ser Val**  
**1 5**

25 <210> 22  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

30 <400> 22  
**Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Ala Thr**  
**1 5**

35 <210> 23  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 23

**Gln Gln Gly His Thr Ala Pro Pro Thr**  
**1 5**

5 <210> 24  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 24

**Gln Gln Gly Ala Thr Leu Pro Pro Thr**  
**1 5**

10 <210> 25  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Construcción sintética

<400> 25

**Gln Gln Gly His Ala Leu Pro Pro Thr**  
**1 5**

20 <210> 26  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 26

**Gln Gln Ala His Thr Leu Pro Pro Thr**  
**1 5**

25 <210> 27  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 27

**Gln Gln Gly His Thr Leu Ala Pro Thr**  
**1 5**

35 <210> 28  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 28  
**Gln Ala Gly His Thr Leu Pro Pro Thr**  
**1 5**

<210> 29  
 <211> 5  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 29  
**Asn Tyr Leu Ile Glu**  
 10 **1 5**

<210> 30  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 30  
**Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Glu Lys Phe Lys**  
**1 5 10 15**  
**Gly**

20 <210> 31  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

25 <400> 31  
**Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Ala Tyr Tyr Ser Glu Lys Phe Lys**  
**1 5 10 15**  
**Gly**

<210> 32  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 32  
**Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Gln Tyr Tyr Ser Glu Lys Phe Lys**  
**1 5 10 15**  
**Gly**

35 <210> 33  
 <211> 5

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 5 <400> 33  
**Asp Arg Leu Asp Tyr**  
**1 5**  
  
 <210> 34  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 34  
**Ala Arg Leu Asp Tyr**  
**1 5**  
  
 15 <210> 35  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 35  
**Asp Ala Leu Asp Tyr**  
**1 5**  
  
 <210> 36  
 <211> 5  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 36  
**Asp Arg Ala Asp Tyr**  
 30 **1 5**  
  
 <210> 37  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 35 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 37  
**His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Ile Val**  
**1 5 10**

- <210> 38  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>  
 <223> Construcción sintética
- <400> 38  
**His Gly Thr Asn Leu Glu Asp**  
 1 5
- 10 <210> 39  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> Construcción sintética
- 15 <400> 39  
**His Gly Thr Asn Leu Glu Ser**  
 1 5
- <210> 40  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> Construcción sintética
- <400> 40  
**His Gly Thr Asn Leu Glu Glu**  
 1 5
- 25 <210> 41  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 30 <223> Construcción sintética
- <400> 41  
**His Gly Thr Asn Leu Glu Gln**  
 1 5
- <210> 42  
 <211> 9  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> Construcción sintética
- <400> 42

**Val His Tyr Ala Gln Phe Pro Tyr Thr**  
**1 5**

<210> 43  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 43

**Ala His Tyr Ala Gln Phe Pro Tyr Thr**  
**1 5**

10 <210> 44  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Construcción sintética

<400> 44

**Val Ala Tyr Ala Gln Phe Pro Tyr Thr**  
**1 5**

20 <210> 45  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 45

**Val His Ala Ala Gln Phe Pro Tyr Thr**  
**1 5**

25 <210> 46  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 30 <223> Construcción sintética

<400> 46

**Val His Tyr Ala Ala Phe Pro Tyr Thr**  
**1 5**

35 <210> 47  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética



<400> 47  
**Val His Tyr Ala Gln Ala Pro Tyr Thr**  
 1 5

<210> 48  
 <211> 9  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 48  
**Val His Tyr Ala Gln Phe Ala Tyr Thr**  
 10 1 5

<210> 49  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 49  
**Val His Tyr Ala Gln Phe Pro Ala Thr**  
 1 5

20 <210> 50  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

25 <400> 50  
**Asp Tyr Gly Val Leu**  
 1 5

<210> 51  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 51  
**Met Ile Trp Ser Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser**  
 1 5 10 15

35 <210> 52  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 52  
**Glu Glu Met Asp Tyr**  
**1 5**

5 <210> 53  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> Construcción sintética

<400> 53  
**Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe Leu Asn**  
**1 5 10**

<210> 54  
 <211> 7  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 54  
**Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser**  
 20 **1 5**

<210> 55  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 55  
**Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr**  
**1 5**

<210> 56  
 30 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

35 <400> 56

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 57  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 57  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

10

<210> 58  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 58

ES 2 763 898 T3

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 59  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 59  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

10 <210> 60  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Construcción sintética

<400> 60

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Glu Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 61  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 61  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 10 100 105

<210> 62  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 62

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 63  
 <211> 107  
 <212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 63  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Val Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

10 <210> 64  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Construcción sintética

<400> 64

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 65  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

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

10 <210> 66  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Construcción sintética

<400> 66  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30

ES 2 763 898 T3

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 67  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 67  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Val Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

10 <210> 68  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Construcción sintética

<400> 68  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60



Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

- <210> 69
- <211> 107
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 69  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Val Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

- 10 <210> 70
- <211> 117
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 70  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ala  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 71

<211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Construcción sintética

<400> 71  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 72  
 <211> 117  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 72  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

15 <210> 73  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 73

ES 2 763 898 T3

```

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

```

<210> 74  
 <211> 117  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

```

<400> 74
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser
           20           25           30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Ala Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
           50           55           60
Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
           100           105           110
Val Thr Val Ser Ser
           115

```

<210> 75  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Construcción sintética

```

<400> 75
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
           20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45

```

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 76  
 <211> 117  
 <212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 76  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Ala Asp Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

10 <210> 77  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Construcción sintética

<400> 77  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 78

<211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Construcción sintética

<400> 78

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser
          20          25          30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45
Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
          50          55          60
Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65          70          75          80
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
          100          105          110
Val Thr Val Ser Ser
          115
    
```

<210> 79  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15 <400> 79

```

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

<210> 80  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 80

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 81  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 81  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

10 <210> 82  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Construcción sintética

<400> 82  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Ser Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

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

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 83  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 84  
 <211> 117  
 <212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 84  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ala  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Ala Asp Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 85

<211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Construcción sintética

<400> 85

```

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

<210> 86  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15 <400> 86

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser
           20           25           30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
           50           55           60
Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
           100           105           110
Val Thr Val Ser Ser
           115
    
```

<210> 87  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 87



```

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

```

<210> 88  
 <211> 117  
 <212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

```

<400> 88
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser
                20           25           30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
                35           40           45
Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50           55           60
Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85           90           95
Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
                100           105           110
Val Thr Val Ser Ser
                115

```

10 <210> 89  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Construcción sintética

```

<400> 89
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
                20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
                35           40           45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60

```

ES 2 763 898 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Thr Ala Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 90  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 90  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 10 115

<210> 91  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 91  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Leu Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 92  
 <211> 117

20

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

5 <400> 92  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 93  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 93  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Ala Leu Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

15 <210> 94  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> Construcción sintética

<400> 94

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 95  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

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

<210> 96  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 96  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 97  
 <211> 107  
 <212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 97  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Ala Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

10 <210> 98  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Construcción sintética

<400> 98  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 99

<211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Construcción sintética

<400> 99  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Gly His Thr Leu Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 100  
 <211> 117  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 100  
 15 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 101  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 101

```

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

```

<210> 102

<211> 117

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 102

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser
           20           25           30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50           55           60
Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Ala Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
           100           105           110
Val Thr Val Ser Ser
           115

```

10

<210> 103

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 103

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
           20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

```

ES 2 763 898 T3

```

      50              55              60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65              70              75              80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro
      85              90              95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100              105

```

<210> 104

<211> 117

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 104

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1              5              10              15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser
      20              25              30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35              40              45
Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
      50              55              60
Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
Val Leu Ala Pro Arg Trp Ala Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
      100              105              110
Val Thr Val Val Ser
      115

```

10 <210> 105

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 105

```

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

```

<210> 106

<211> 117



<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

5 <400> 106

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser
 20          25          30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35          40          45
Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50          55          60
Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65          70          75          80
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85          90          95
Val Leu Ala Pro Ala Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100          105          110
Val Thr Val Ser Ser
 115
    
```

<210> 107  
 <211> 107  
 <212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 107

```

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

15

<210> 108  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 108

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 109

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 109

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

10 <210> 110

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 110

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

```

    50                      55                      60
Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                      70                      75                      80
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                        85                      90                      95
Val Leu Ala Pro Arg Ala Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
                        100                    105                    110
Val Thr Val Ser Ser
                        115

```

- <210> 111
- <211> 107
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Construcción sintética

```

<400> 111
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1                      5                      10                      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
                        20                      25                      30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
                        35                      40                      45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50                      55                      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                      70                      75                      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro
                        85                      90                      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
                        100                    105

```

- 10 <210> 112
- <211> 117
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>  
15 <223> Construcción sintética

```

<400> 112
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1                      5                      10                      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser
                        20                      25                      30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
                        35                      40                      45
Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50                      55                      60
Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                      70                      75                      80
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                        85                      90                      95
Val Leu Ala Ala Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
                        100                    105                    110
Val Thr Val Ser Ser
                        115

```

<210> 113  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 113  
**Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly**  
**1 5 10 15**  
**Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr**  
**20 25 30**  
**Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile**  
**35 40 45**  
**Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly**  
**50 55 60**  
**Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro**  
**65 70 75 80**  
**Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro**  
**85 90 95**  
**Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys**  
**100 105**

10 <210> 114  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

15 <400> 114  
**Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala**  
**1 5 10 15**  
**Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser**  
**20 25 30**  
**Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile**  
**35 40 45**  
**Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe**  
**50 55 60**  
**Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr**  
**65 70 75 80**  
**Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys**  
**85 90 95**  
**Ala Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu**  
**100 105 110**  
**Val Thr Val Ser Ser**  
**115**

20 <210> 115  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 115

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

<210> 116

<211> 117

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 116

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Ala Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

10 <210> 117

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 117

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 118  
 <211> 114  
 <212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 118  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110  
 Ser Ser

10 <210> 119  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Construcción sintética

<400> 119  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ile Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val His Tyr Ala Gln Phe Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 120  
 20 <211> 114  
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 120

```

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

```

5 Ser Ser

<210> 121

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 121

```

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

```

<210> 122

15 <211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20 <400> 122

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

<210> 123  
 <211> 107  
 <212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 123

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

10 <210> 124  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Construcción sintética

<400> 124



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

<210> 125  
 <211> 107  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 125

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

<210> 126  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 126

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Glu Lys Phe

50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110  
 Ser Ser

<210> 127

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 127

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

10 <210> 128

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 128

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

<210> 129  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 129  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ile Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val His Tyr Ala Gln Phe Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

10 <210> 130  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Construcción sintética

<400> 130  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110  
 Ser Ser

<210> 131  
 <211> 107  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 131

```

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

<210> 132

<211> 114

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 132

```

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

<210> 133

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 133

```

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

```

<210> 134

<211> 114

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 134

```

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

```

10 <210> 135

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 135

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
           20           25           30
Ile Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
           35           40           45
Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60

```



Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val His Tyr Ala Gln Phe Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 136

<211> 114

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 136

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

10 Ser Ser

<210> 137

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 137

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

<210> 138

<211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Construcción sintética

<400> 138  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110  
 Ser Ser

<210> 139  
 <211> 107  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 139  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ile Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val His Tyr Ala Gln Phe Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

15  
 <210> 140  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 140

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

<210> 141

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 141

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

10

<210> 142

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 142

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Glu Lys Phe



ES 2 763 898 T3

```

      50                      55                      60
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                      70                      75                      80
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95
Ala Arg Asp Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
      100                      105                      110
Ser Ser

```

<210> 143

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 143

```

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

```

10 <210> 144

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 144

```

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

```

<210> 145  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 145  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ile Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Gly Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val His Tyr Ala Gln Phe Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

10 <210> 146  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

15 <400> 146  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110  
 Ser Ser

20 <210> 147  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 147

```

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

<210> 148

<211> 114

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 148

```

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

<210> 149

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 149

```

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

```

<210> 150

<211> 114

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 150

```

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

```

10 <210> 151

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 151

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
           20           25           30
Ile Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
           35           40           45
Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

```

ES 2 763 898 T3

```

      50              55              60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65              70              75              80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val His Ala Ala Gln Phe Pro Tyr
      85              90              95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100              105

```

<210> 152

<211> 114

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 152

```

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

```

10 <210> 153

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 153

```

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

```

<210> 154

20 <211> 114

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

5 <400> 154

```

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

<210> 155  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 155

```

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

15 <210> 156  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

20

<400> 156



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

<210> 157

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 157

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

10 <210> 158

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 158

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

ES 2 763 898 T3

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110  
 Ser Ser

<210> 159  
 <211> 107  
 <212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 159  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ile Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val His Tyr Ala Gln Phe Pro Ala  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

10 <210> 160  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Construcción sintética

<400> 160  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Ala Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110  
 Ser Ser

<210> 161



<211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Construcción sintética

<400> 161  
**Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly**  
**1 5 10 15**  
**Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr**  
**20 25 30**  
**Ile Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile**  
**35 40 45**  
**Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly**  
**50 55 60**  
**Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro**  
**65 70 75 80**  
**Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val His Tyr Ala Gln Phe Pro Tyr**  
**85 90 95**  
**Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys**  
**100 105**

<210> 162  
 <211> 114  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 162  
**Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala**  
**1 5 10 15**  
**Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr**  
**20 25 30**  
**Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile**  
**35 40 45**  
**Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Glu Lys Phe**  
**50 55 60**  
**Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr**  
**65 70 75 80**  
**Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys**  
**85 90 95**  
**Ala Arg Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val**  
**100 105 110**

15 **Ser Ser**

<210> 163  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 163

```

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

```

- <210> 164
- <211> 114
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Construcción sintética

```

<400> 164
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
           20           25           30
Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Glu Lys Phe
           50           55           60
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Arg Asp Arg Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
           100           105           110

```

- 10 Ser Ser
- <210> 165
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Construcción sintética

```

<400> 165
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
           20           25           30
Ile Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
           35           40           45

```

Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val His Tyr Ala Gln Phe Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 166  
 <211> 113  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 166  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Gly Val Leu Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Met Ile Trp Ser Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile  
 50 55 60  
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val  
 85 90 95  
 Arg Glu Glu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 100 105 110  
 10 Ser

<210> 167  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 167  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 168  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 168  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Gly Val Leu Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Met Ile Trp Ser Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile  
 50 55 60  
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val  
 85 90 95  
 Arg Glu Glu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 100 105 110  
 Ser

10 <210> 169  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

15 <400> 169  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

20 <210> 170  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 170

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

- <210> 171
- <211> 107
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 171  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 10 100 105

- <210> 172
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Construcción sintética

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1

- 20 <223> Xaa = D o E

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2  
 <223> Xaa = S o A

<400> 172  
**Xaa Xaa Tyr Met Ser**  
**1 5**

<210> 173  
 <211> 17  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<220>  
 10 <221> VARIANTE  
 <222> 6  
 <223> Xaa = N o S

<220>  
 15 <221> VARIANTE  
 <222> 7  
 <223> Xaa = A o G

<220>  
 20 <221> VARIANTE  
 <222> 8  
 <223> Xaa = D o S

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 9  
 <223> Xaa = A o S

25 <400> 173  
**Asp Met Tyr Pro Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg**  
**1 5 10 15**  
**Glu**

<210> 174  
 <211> 8  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<220>  
 35 <221> VARIANTE  
 <222> 5  
 <223> Xaa = Y o A

<220>  
 40 <221> VARIANTE  
 <222> 6  
 <223> Xaa = A o F

<220>  
 <221> VARIANTE

- <222> 7  
 <223> Xaa = S o A
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 5 <222> 8  
 <223> Xaa = A o V
- <400> 174  
**Ala Pro Arg Trp Xaa Xaa Xaa Xaa**  
 1 5
- <210> 175  
 10 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> Construcción sintética
- 15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2  
 <223> Xaa = A o Q
- 20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 3  
 <223> Xaa = A o G
- 25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa = A o H
- 30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 5  
 <223> Xaa = A o T
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 6  
 <223> Xaa = A o L
- 35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 7  
 <223> Xaa = A o P
- 40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 8  
 <223> Xaa = A o P
- <400> 175

**Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr**  
**1 5**

<210> 176  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética

<220>  
 <221> VARIANTE  
 10 <222> 9  
 <223> Xaa = T, A o Q

<400> 176  
**Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Xaa Tyr Tyr Ser Glu Lys Phe Lys**  
**1 5 10 15**

**Gly**

15 <210> 177  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> Construcción sintética

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 7  
 <223> Xaa = S, E o Q  
 25 <400> 177

**His Gly Thr Asn Leu Glu Xaa**  
**1 5**

<210> 178  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética

<220>  
 <221> VARIANTE  
 35 <222> 1  
 <223> Xaa = V o A

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2  
 40 <223> Xaa = H o A

<220>  
 <221> VARIANTE



<222> 9  
 <223> Xaa = Y o A

<400> 178  
 Xaa Xaa Tyr Ala Gln Phe Pro Tyr Xaa  
 1 5

5 <210> 179  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> Construcción sintética

<400> 179  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Phe Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Val Ala Ala Tyr Phe Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

15 <210> 180  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

20 <400> 180  
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Thr Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Glu Lys Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Phe Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 181

<211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Construcción sintética

<400> 181  
 Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ile Val Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Arg Gly Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val His Tyr Ala Gln Phe Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 182  
 <211> 114  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 182  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
 100 105 110

15 Ser Ser  
 <210> 183  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 183

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser
          20          25          30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45
Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
          50          55          60
Arg Glu Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
          100          105          110
Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 184

<211> 117

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 184

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser
          20          25          30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45
Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
          50          55          60
Arg Glu Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
          100          105          110
Val Thr Val Ser Ser
          115

```

10 <210> 185

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 185

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
          20          25

```

- <210> 186  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>  
 <223> Construcción sintética
- <400> 186  
**Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val**  
 1 5 10
- 10 <210> 187  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> Construcción sintética
- 15 <400> 187  
**Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln**  
 1 5 10 15  
**Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys**  
 20 25 30
- 20 <210> 188  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> Construcción sintética
- <400> 188  
**Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser**  
 1 5 10
- 25 <210> 189  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> Construcción sintética
- 30 <400> 189  
**Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly**  
 1 5 10 15  
**Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys**  
 20
- 35 <210> 190  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 190

**Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr**  
**1 5 10 15**

5 <210> 191

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 191

**Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr**  
**1 5 10 15**  
**Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys**  
**20 25 30**

<210> 192

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 192

20 **Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys**  
**1 5 10**

<210> 193

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 193

**Asp Met Tyr Pro Asp Ala Ala Ala Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg**  
**1 5 10 15**  
**Glu**

<210> 194

30 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

35 <400> 194

**Ala Pro Arg Trp Ala Ala Ala Ala**  
**1 5**

- <210> 195  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>  
 <223> Construcción sintética
- <400> 195  
**Gln Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr**  
 1 5
- 10 <210> 196  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> Construcción sintética
- 15 <400> 196  
**Ala Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val**  
 1 5 10
- <210> 197  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> Construcción sintética
- <400> 197  
**Ala Arg Ala Arg Leu Asp Tyr**  
 1 5
- 25 <210> 198  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 30 <223> Construcción sintética
- <400> 198  
**Ala Arg Asp Ala Leu Asp Tyr**  
 1 5
- <210> 199  
 <211> 7  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> Construcción sintética
- <400> 199

**Ala Arg Asp Arg Ala Asp Tyr**  
**1 5**

<210> 200  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 200  
**Ala Arg Asp Arg Leu Asp Tyr**  
**1 5**

10 <210> 201  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Construcción sintética

<400> 201  
**Val Ala Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val**  
**1 5 10**

20 <210> 202  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 202  
**Val Leu Ala Ala Arg Trp Tyr Phe Ser Val**  
**1 5 10**

25 <210> 203  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 30 <223> Construcción sintética

<400> 203  
**Val Leu Ala Pro Ala Trp Tyr Phe Ser Val**  
**1 5 10**

35 <210> 204  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 204  
**Val Leu Ala Pro Arg Ala Tyr Phe Ser Val**  
 1 5 10

<210> 205  
 <211> 10  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 205  
**Val Leu Ala Pro Arg Trp Ala Phe Ser Val**  
 10 1 5 10

<210> 206  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 206  
**Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Ala Ser Val**  
 1 5 10

20 <210> 207  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

25 <400> 207  
**Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ala Val**  
 1 5 10

<210> 208  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 208  
**Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Ala**  
 1 5 10

35 <210> 209  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial



<220>

<223> Construcción sintética

<400> 209

Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val  
1 5 10

5

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo agonista anti-OX40 humano, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 y un dominio variable de la cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57.
- 10 2. El anticuerpo agonista anti-OX40 humano de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo disminuye las células que expresan OX40 humano *in vitro* y se une a OX40 humano con una afinidad igual a aproximadamente 0,45 nM como se determina usando radioinmunoanálisis.
- 15 3. El anticuerpo agonista anti-OX40 humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el anticuerpo disminuye los linfocitos T efectores CD4+ o linfocitos T reguladores (Treg).
- 20 4. El anticuerpo agonista anti-OX40 humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la disminución es por ADCC y/o fagocitosis.
- 25 5. El anticuerpo agonista anti-OX40 humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo se une a OX40 humano y a OX40 de macaco cangrejero.
- 30 6. El anticuerpo agonista anti-OX40 humano de la reivindicación 5, en el que la unión a OX40 expresado en la superficie celular en linfocitos T humanos y de macaco cangrejero del anticuerpo frente a OX40 marcado se determina usando un ensayo por FACS y la unión a OX40 humano tiene una CE<sub>50</sub> de menos de o igual a 0,3 µg/ml y la unión a OX40 de macaco cangrejero tiene una CE<sub>50</sub> de menos de o igual a 1,5 µg/ml.
- 35 7. El anticuerpo agonista anti-OX40 humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se requiere la reticulación del anticuerpo para la función del anticuerpo agonista anti-OX40 humano.
- 40 8. El anticuerpo agonista anti-OX40 humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 humano de longitud completa.
- 45 9. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 50 10. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 9.
- 55 11. Un procedimiento de producción de un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 10 de modo que se produzca el anticuerpo.
- 60 12. El procedimiento de la reivindicación 11, que comprende además recuperar el anticuerpo de la célula huésped.
- 65 13. Un inmunocombinado que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un agente citotóxico.
14. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
15. La formulación farmacéutica de la reivindicación 14, que comprende (a) el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 a una concentración de entre aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, (b) un polisorbato, en la que la concentración de polisorbato es de aproximadamente un 0,02 % p/v a aproximadamente un 0,06 % p/v; (c) un tampón histidina a pH de 5,0 a 6,0; y (d) un sacárido, en la que la concentración de sacárido es de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 320 mM.
16. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como un medicamento.
17. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento del cáncer.
18. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene cáncer que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un agente terapéutico adicional.
19. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en un procedimiento de la reivindicación 18, en el que el agente terapéutico adicional comprende un agente quimioterápico.
20. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en un procedimiento de la reivindicación 18, en el que el agente terapéutico adicional comprende un antagonista de unión al eje de PD-1.

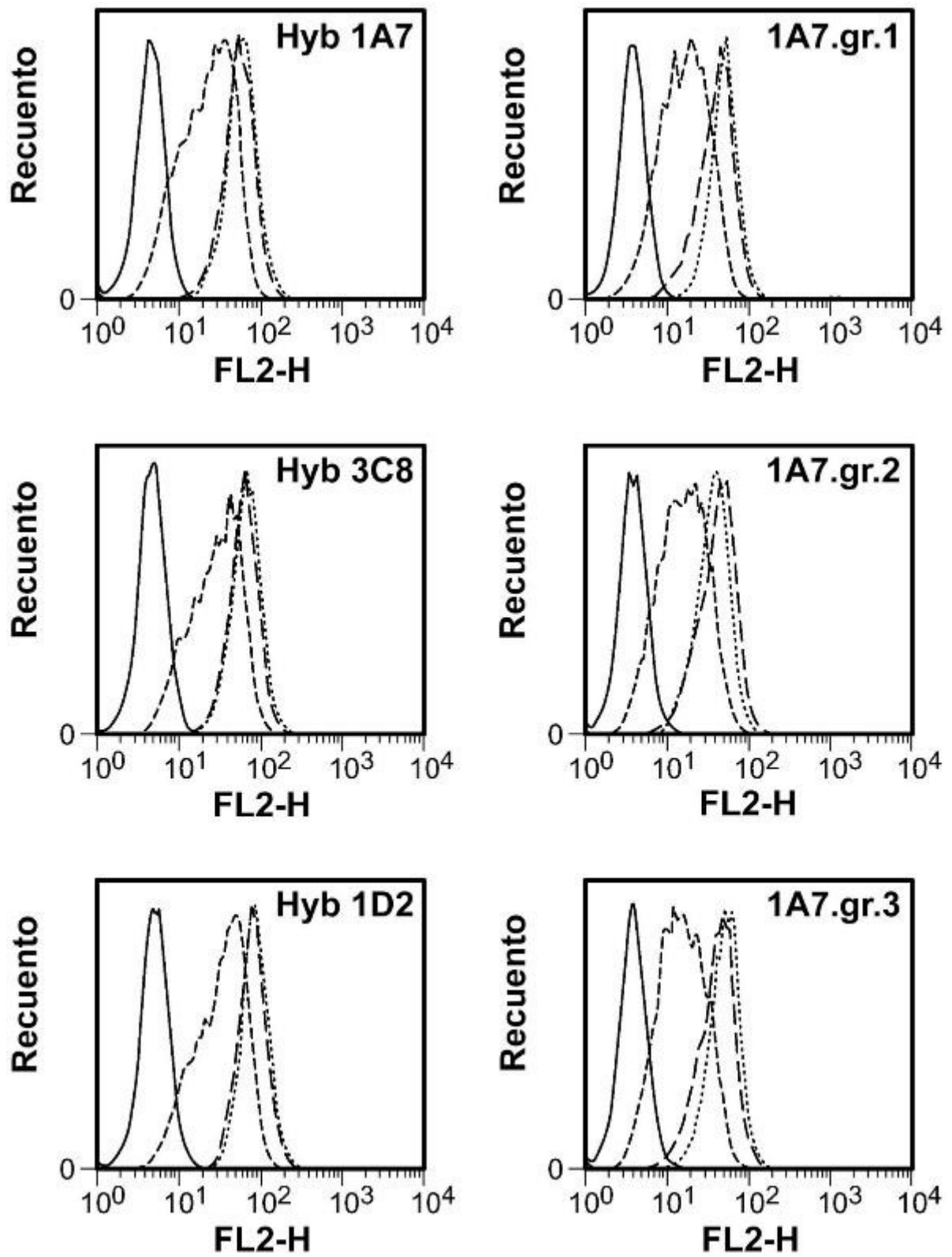


FIG. 1

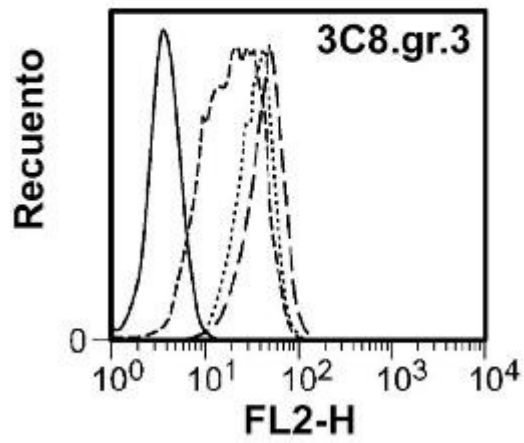
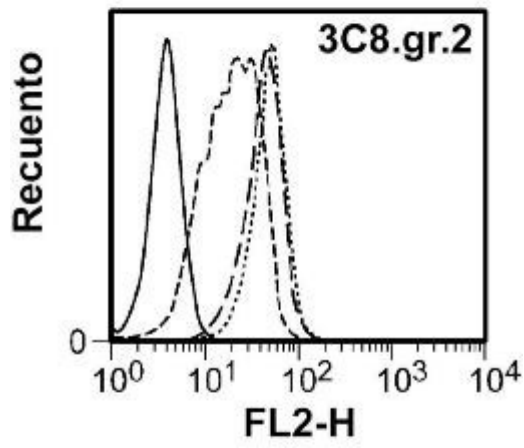
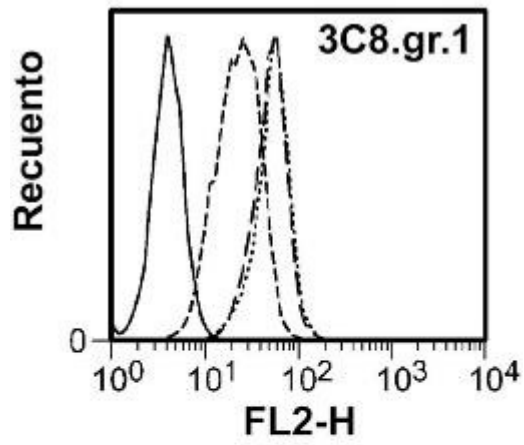


FIG. 1 (cont.)

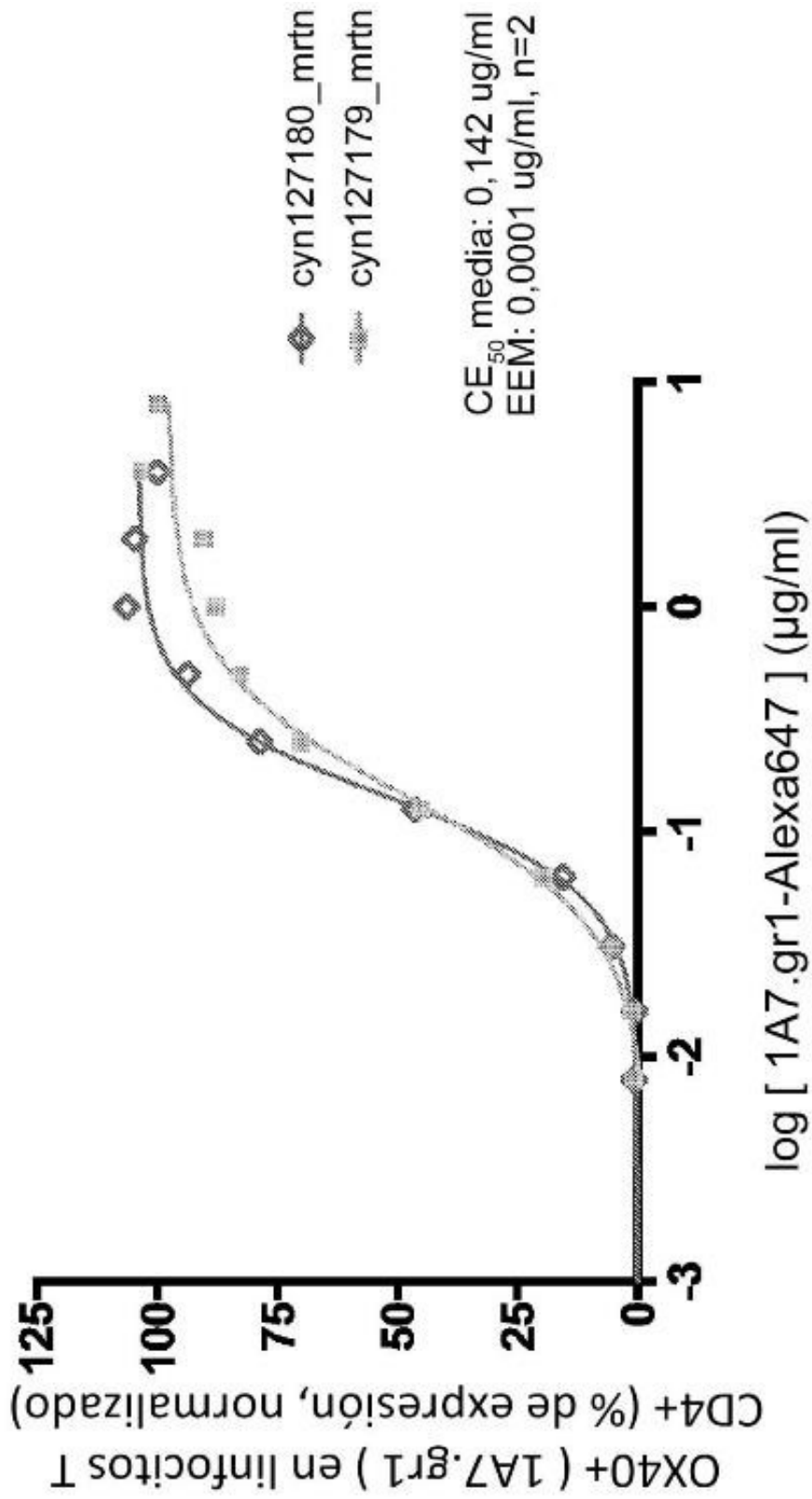
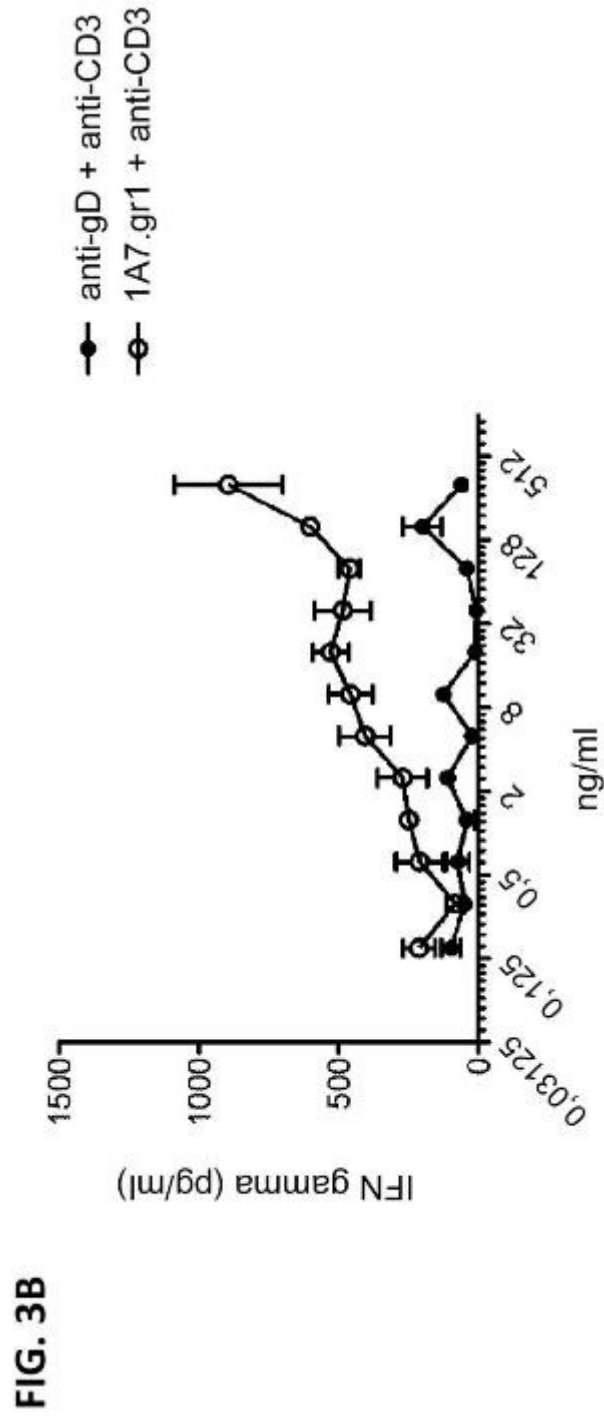
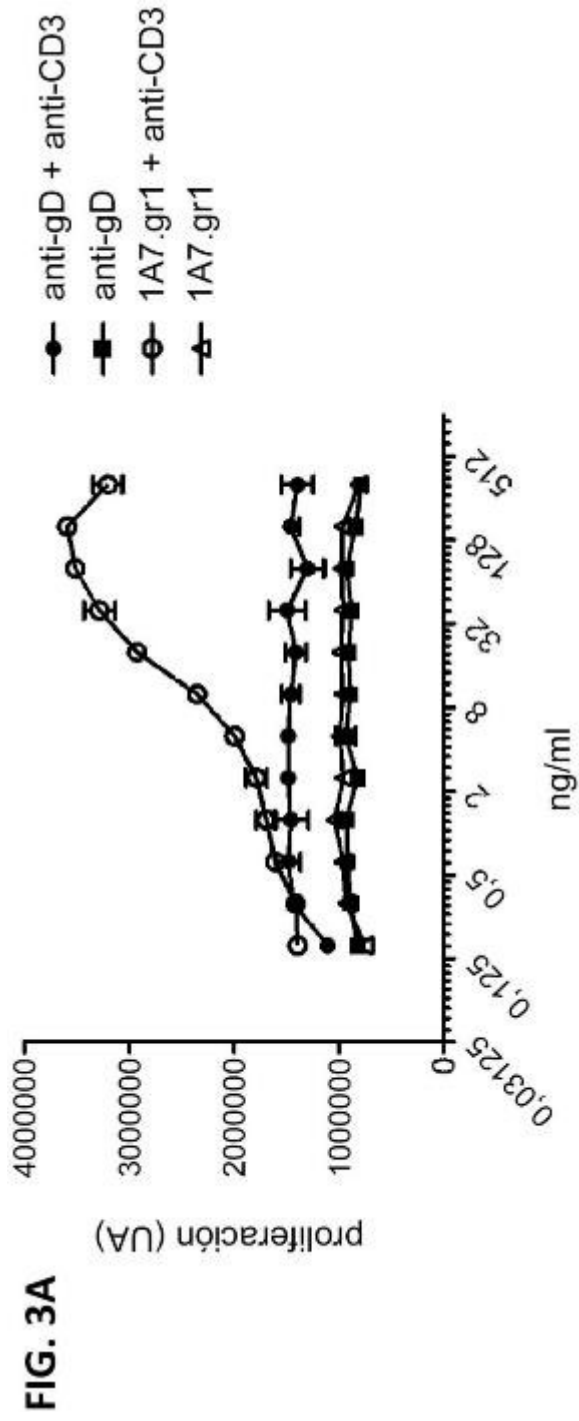


FIG. 2



**FIGS. 3A y 3B**

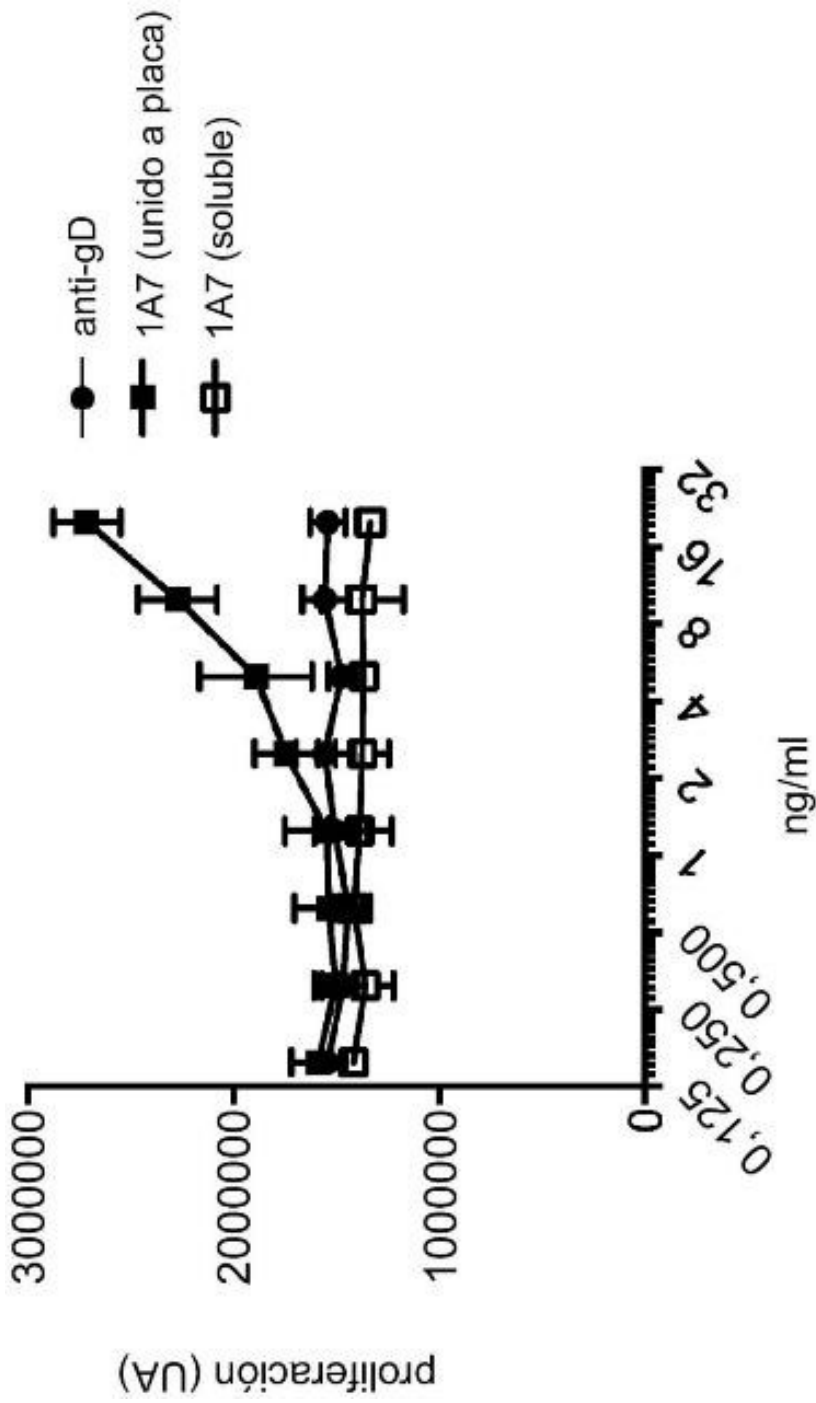


FIG. 4A

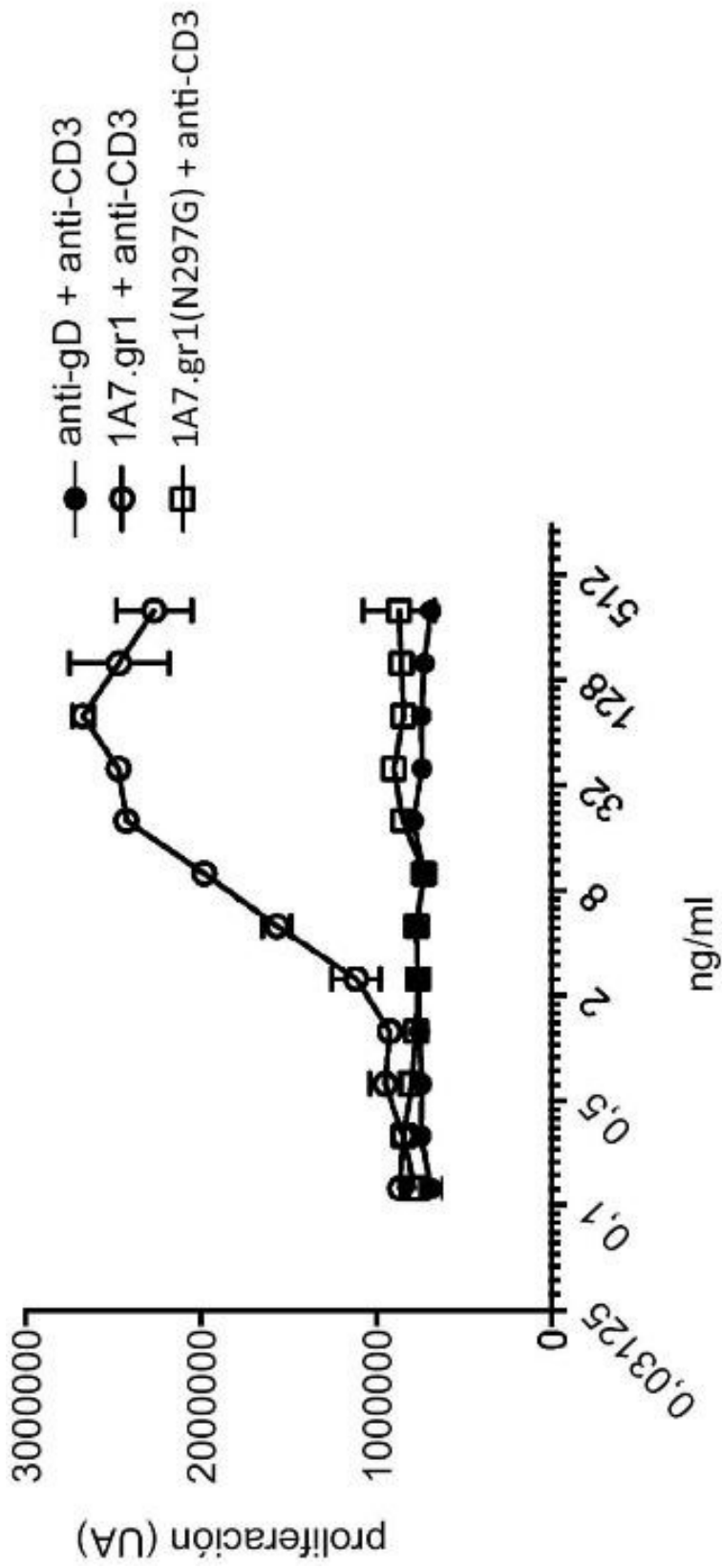


FIG. 4B



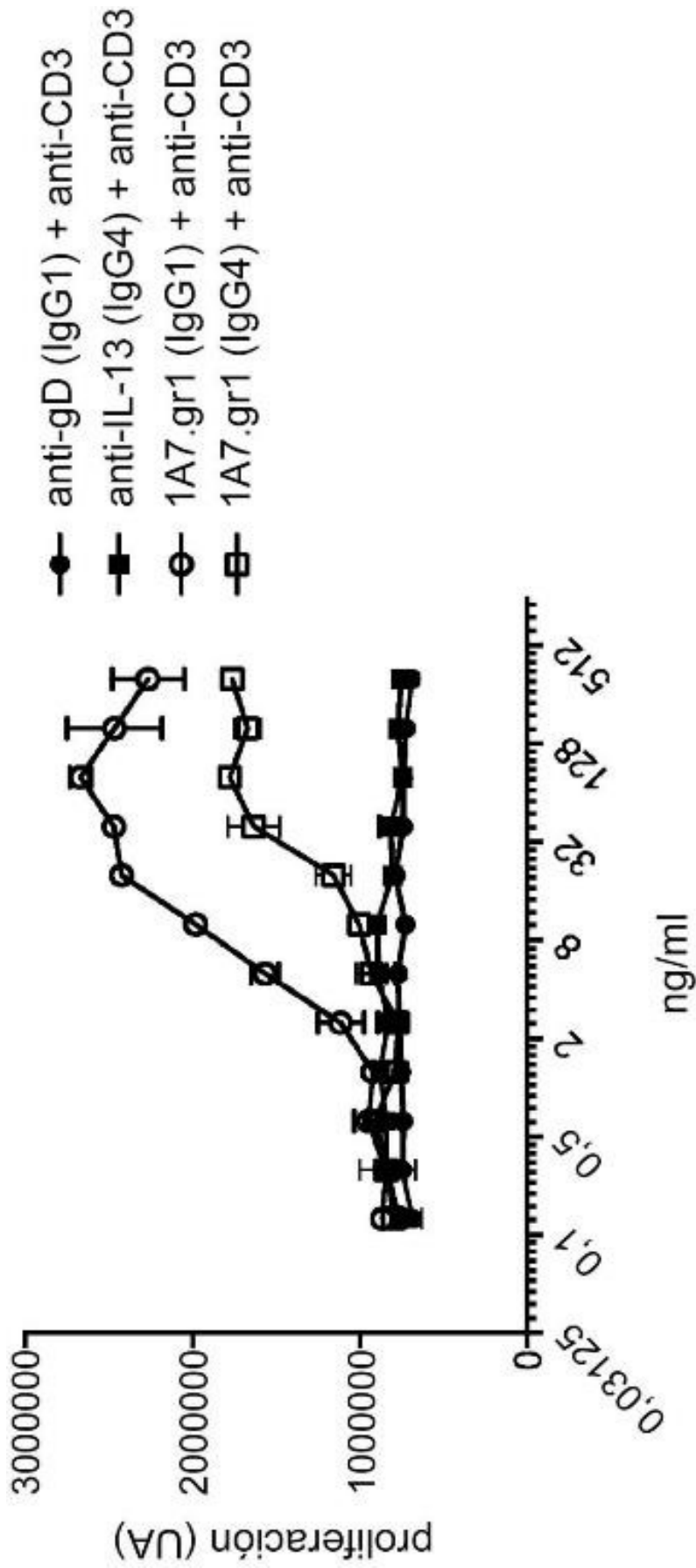


FIG. 5

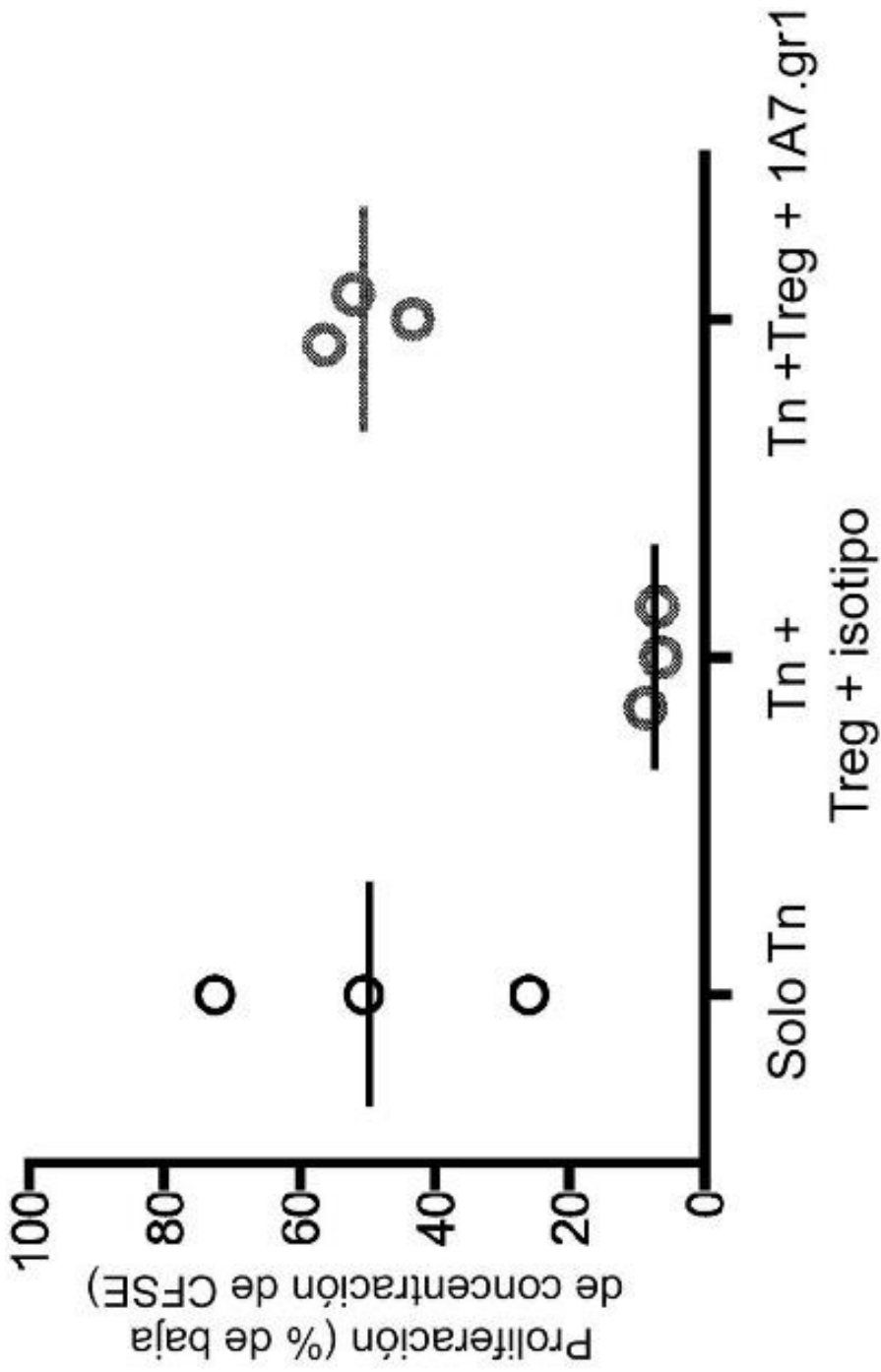


FIG. 6

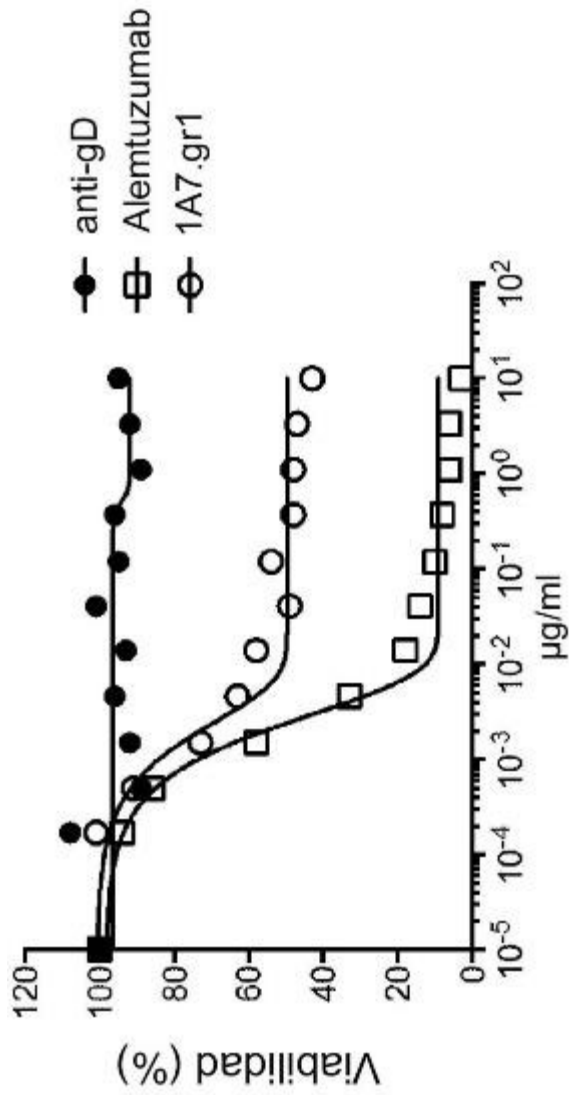


FIG. 7A

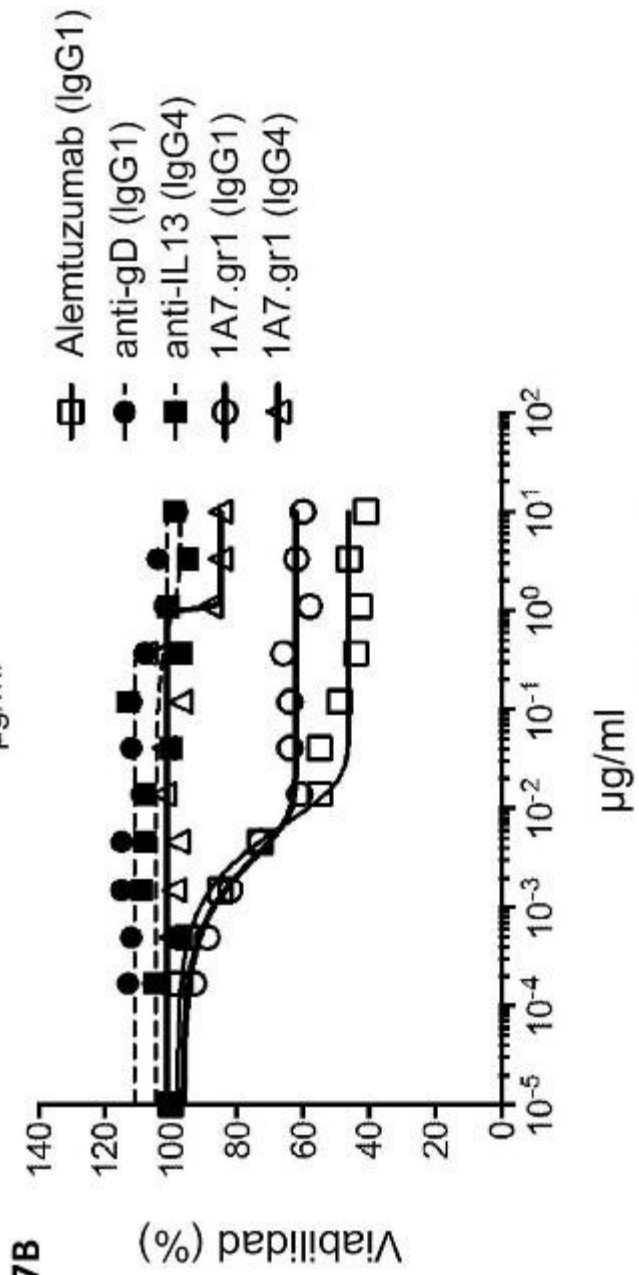
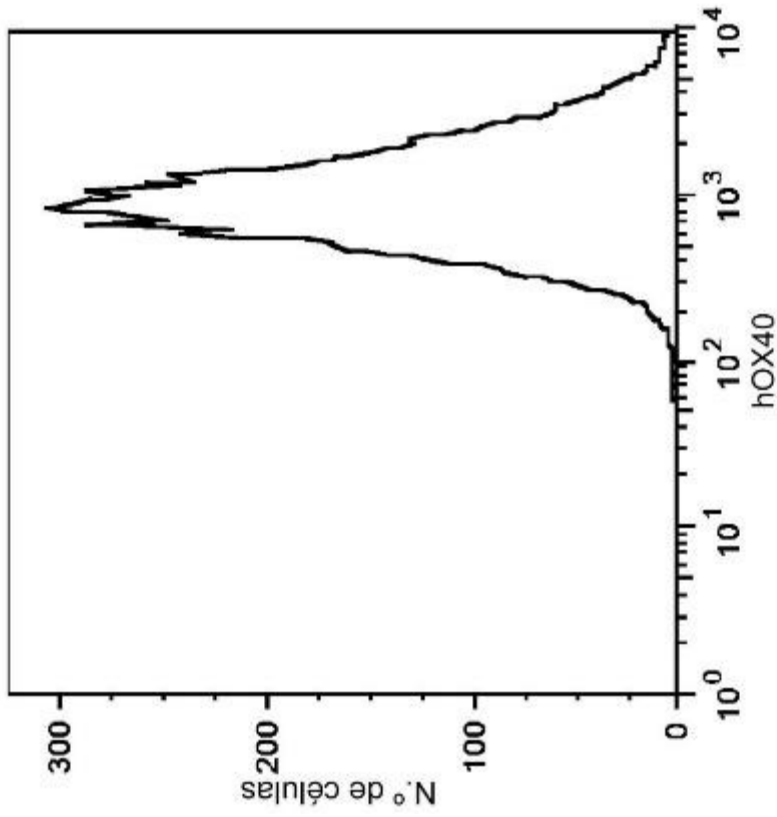


FIG. 7B

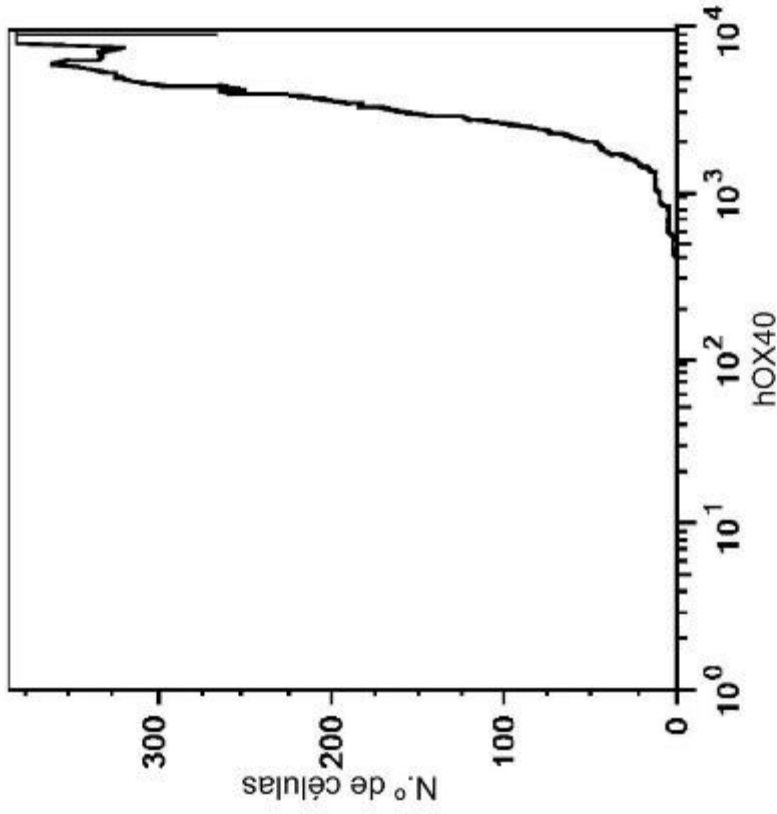
FIGS. 7A Y 7B

FIG. 8A



BT474-hOX40 de baja  
expresión

FIG. 8B



BT474-hOX40 de alta  
expresión

FIGS. 8A Y 8B

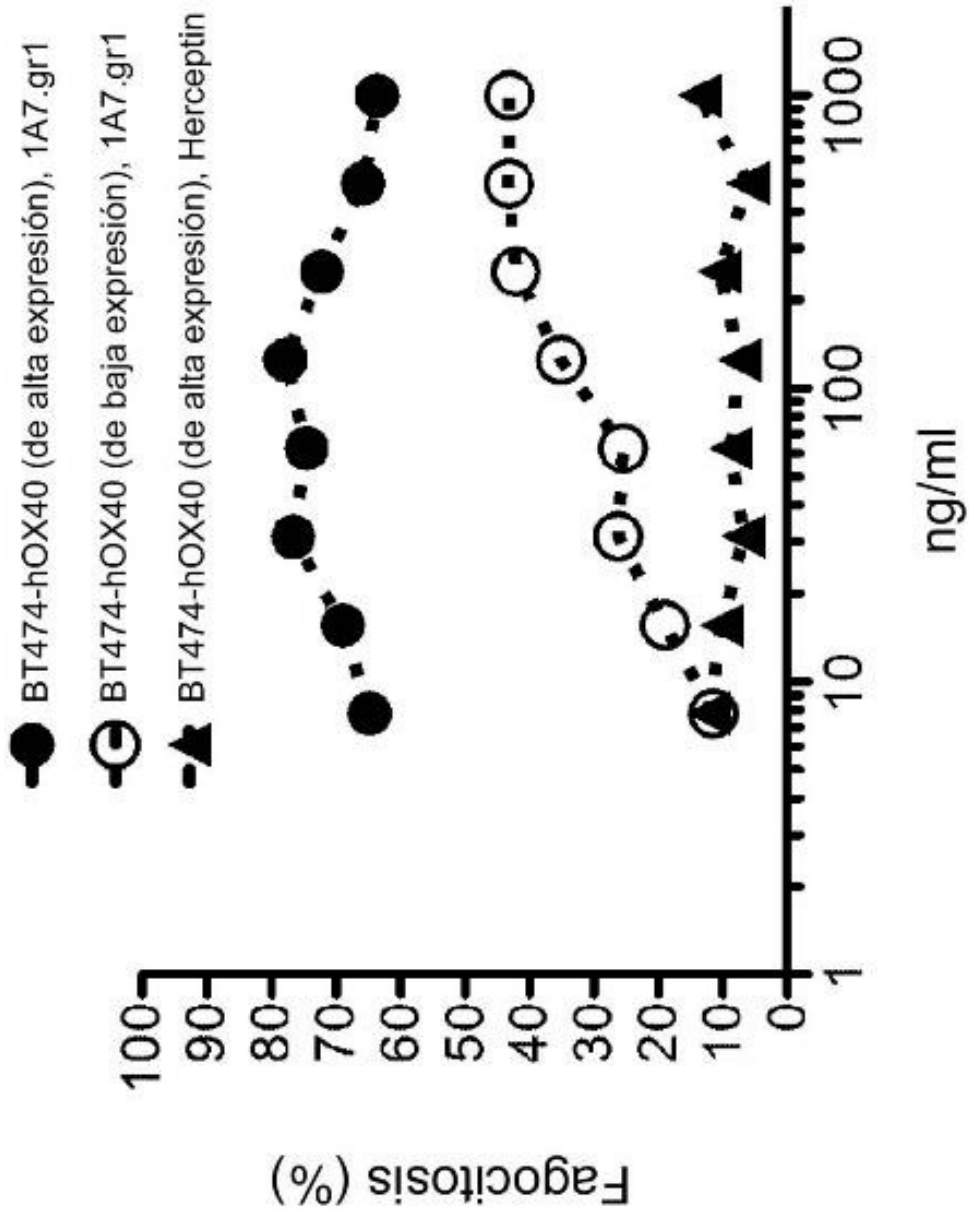


FIG. 9

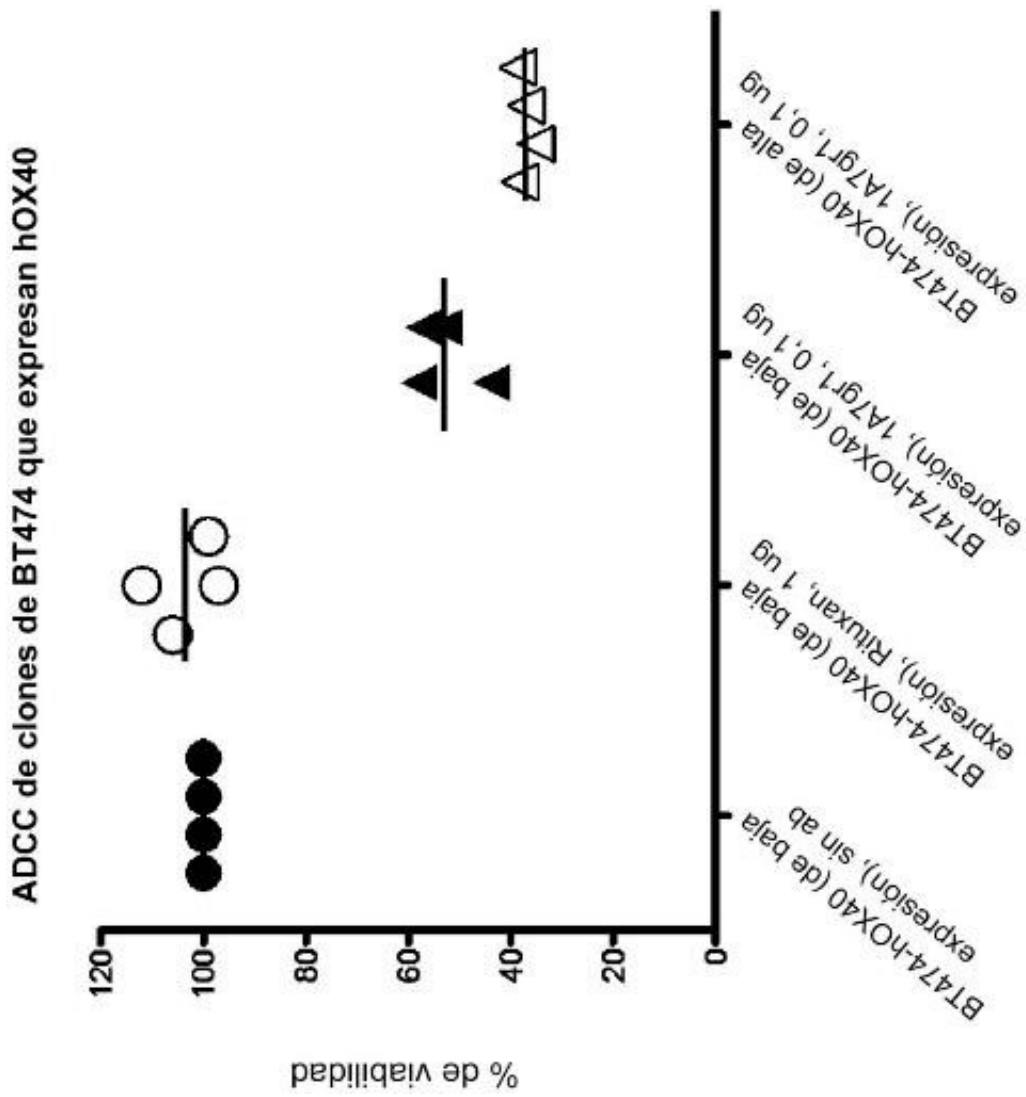


FIG. 10



3C8.gr.5.QG DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCHASODI SSI VWYQQKPGK  
 3C8.gr.6 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCHASODI SSI VWYQQKPGK  
 3C8.gr.7 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCHASODI SSI VWYQQKPGK  
 3C8.gr.8 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCHASODI SSI VWYQQKPGK  
 3C8.gr.9 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCHASODI SSI VWYQQKPGK  
 3C8.gr.10 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCHASODI SSI VWYQQKPGK  
 3C8.gr.11 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCHASODI SSI VWYQQKPGK  
 3C8.A.1 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCHASODI SSI VWYQQKPGK  
 3C8.A.2 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCHASODI SSI VWYQQKPGK  
 3C8.A.3 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCHASODI SSI VWYQQKPGK  
 3C8.A.4 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCHASODI SSI VWYQQKPGK  
 3C8.A.5 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCHASODI SSI VWYQQKPGK  
 3C8.A.6 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCHASODI SSI VWYQQKPGK  
 3C8.A.7 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCHASODI SSI VWYQQKPGK  
 3C8.A.8 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCHASODI SSI VWYQQKPGK  
 3C8.A.9 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCHASODI SSI VWYQQKPGK  
 3C8.A.10 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCHASODI SSI VWYQQKPGK  
 1D2 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCRASODI SNFLNMYQQKPGK  
 1D2.gr.1 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCRASODI SNFLNMYQQKPGK  
 1D2.gr.2 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCRASODI SNFLNMYQQKPGK  
 1D2.gr.3 DIQMTOSPSSL SASSVGD RVTITCRASODI SNFLNMYQQKPGK

CPR17 - Contacts  
 CPY17 - Contacts  
 CAR17 - Kabel

Numero da Kabel: 1A7  
 1A7.gr.1 APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.gr.2 APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.gr.3 APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.gr.4 TVKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.gr.5 IVKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.gr.6 TVKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.gr.7 TVKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.gr.DA APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.gr.ES APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.gr.NADS APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.gr.NADA APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.gr.NGDA APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.gr.SGDS APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.gr.NGSS APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.gr.DANADA APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.Ala.1 APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.Ala.2 APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.Ala.3 APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.Ala.4 APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.Ala.5 APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.Ala.6 APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.Ala.7 APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.Ala.8 APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.Ala.9 APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA  
 1A7.Ala.10 APKLL YTSRLRSGVPSRFSGSGGTOFTLTISSNLCQEDFA

FIG. 11B



|             |                                              |
|-------------|----------------------------------------------|
| 1A7.Ala.11  | APKLLIYYTSRRLRSRSGVPSRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA |
| 1A7.Ala.12  | APKLLIYYTSRRLRSRSGVPSRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA |
| 1A7.Ala.13  | APKLLIYYTSRRLRSRSGVPSRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA |
| 1A7.Ala.14  | APKLLIYYTSRRLRSRSGVPSRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA |
| 1A7.Ala.15  | APKLLIYYTSRRLRSRSGVPSRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA |
| 1A7.Ala.16  | APKLLIYYTSRRLRSRSGVPSRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA |
| 3C8         | SI RGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGADYSLTSSLESDTA  |
| 3C8.gr.1    | APKLLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.gr.2    | APKLLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.gr.3    | APKLLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.gr.4    | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.gr.5    | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.gr.5.DA | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.gr.5.DQ | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.gr.5.SG | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.gr.5.EC | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.gr.5.QG | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.gr.6    | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGADYSLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.gr.7    | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGADYSLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.gr.8    | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.gr.9    | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.gr.10   | APKLLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.gr.11   | APKLLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.A.1     | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.A.2     | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.A.3     | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.A.4     | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.A.5     | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.A.6     | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.A.7     | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.A.8     | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.A.9     | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 3C8.A.10    | SFKGLIYHGTNLEDDGVP SRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA  |
| 1D2         | TVKLLIYYTSRRLHSGVPSRFRSGSGGTDYSLTSSNLEQEDFA  |
| 1D2.gr.1    | APKLLIYYTSRRLHSGVPSRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA   |
| 1D2.gr.2    | APKLLIYYTSRRLHSGVPSRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA   |
| 1D2.gr.3    | APKLLIYYTSRRLHSGVPSRFRSGSGGTDFTLTSSLQPEDFA   |

CDR 3 - Continuo  
 CDR 3 - Kabal

|                 |                        |
|-----------------|------------------------|
| Numero ca Kabal | TYFCQQGHTLPTTFGGTKLEIK |
| 1A7             | TYFCQQGHTLPTTFGGTKLEIK |
| 1A7.gr.1        | TYFCQQGHTLPTTFGGTKLEIK |
| 1A7.gr.2        | TYFCQQGHTLPTTFGGTKLEIK |
| 1A7.gr.3        | TYFCQQGHTLPTTFGGTKLEIK |
| 1A7.gr.4        | TYFCQQGHTLPTTFGGTKLEIK |
| 1A7.gr.5        | TYFCQQGHTLPTTFGGTKLEIK |
| 1A7.gr.6        | TYFCQQGHTLPTTFGGTKLEIK |
| 1A7.gr.7        | TYFCQQGHTLPTTFGGTKLEIK |
| 1A7.gr.DA       | TYFCQQGHTLPTTFGGTKLEIK |

FIG. 11C

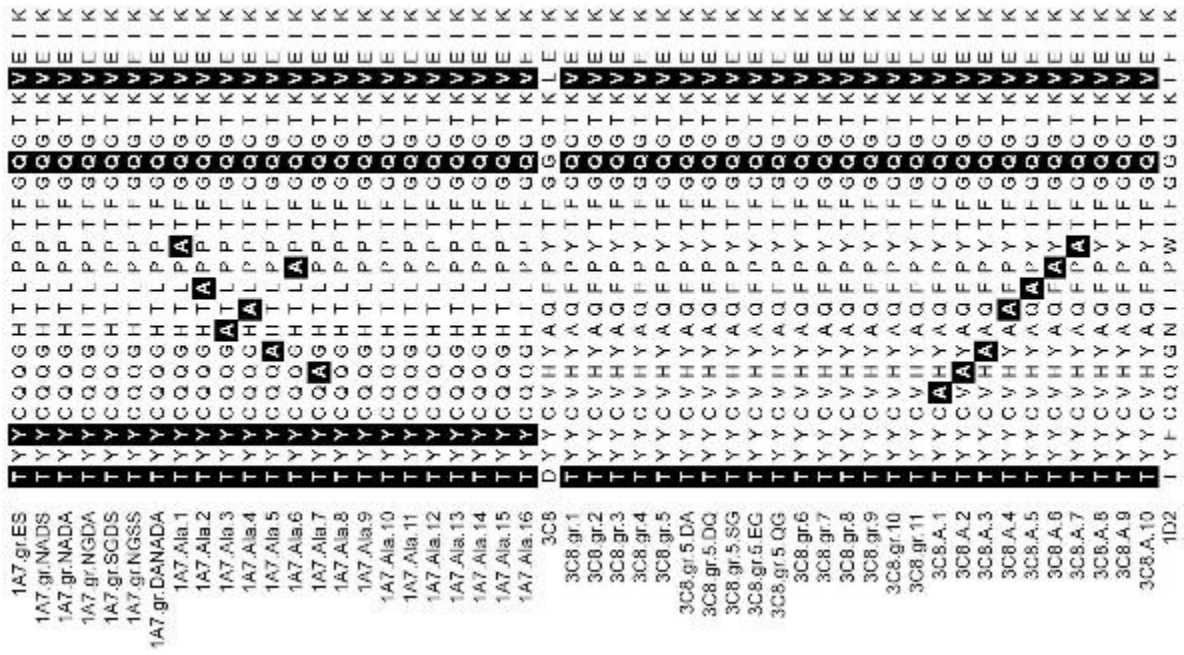


FIG. 11D



3C8.gr.5.QG EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTNYLIEWV RQA PG  
 3C8.gr.6 EVQLVQSGALVKKPGASVKVSCKASGYSFTNYLIEWV RQA PG  
 3C8.gr.7 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTNYLIEWV RQA PG  
 3C8.gr.8 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTNYLIEWV RQA PG  
 3C8.gr.9 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTNYLIEWV RQA PG  
 3C8.gr.10 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTNYLIEWV RQA PG  
 3C8.A.1 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTNYLIEWV RQA PG  
 3C8.A.2 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTNYLIEWV RQA PG  
 3C8.A.3 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTNYLIEWV RQA PG  
 3C8.A.4 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTNYLIEWV RQA PG  
 3C8.A.5 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTNYLIEWV RQA PG  
 3C8.A.6 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTNYLIEWV RQA PG  
 3C8.A.7 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTNYLIEWV RQA PG  
 3C8.A.8 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTNYLIEWV RQA PG  
 3C8.A.9 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTNYLIEWV RQA PG  
 3C8.A.10 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTNYLIEWV RQA PG  
 1D2 QVQIKQSGPGLVQPSLSISICTVSGFSLDYGVLVWRQSPG  
 1D2.gr.1 EVQLVESGPGLVKPS~~ETLS~~LTCTVSGFSLDYGVLVWRQSPG  
 1D2.gr.2 EVQLVESGPGLVKPS~~ETLS~~LTCTVSGFSLDYGVLVWRQSPG  
 1D2.gr.3 EVQLVESGPGLVKPS~~ETLS~~LTCTVSGFSLDYGVLVWRQSPG

COR 112 - Cambios

COR 112 - Kabat

Numero de Kabat: 1A7  
 1A7.gr.1 QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.gr.2 QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.gr.3 QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.gr.4 QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.gr.5 QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.gr.6 QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.gr.7 QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.gr.DA QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.gr.ES QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.gr.NADS QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.gr.NADA QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.gr.NGDA QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.gr.SGDS QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.gr.NGSS QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.gr.DANADA QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.Ala.1 QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.Ala.2 QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.Ala.3 QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.Ala.4 QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.Ala.5 QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.Ala.6 QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.Ala.7 QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.Ala.8 QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS  
 1A7.Ala.9 QG LEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRFRVITTRDTSSTAYLELS

FIG. 11F

|             |                                            |
|-------------|--------------------------------------------|
| 1A7.Ala.10  | QGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTAYLELS   |
| 1A7.Ala.11  | QGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTAYLELS   |
| 1A7.Ala.12  | QGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTAYLELS   |
| 1A7.Ala.13  | QGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTAYLELS   |
| 1A7.Ala.14  | QGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTAYLELS   |
| 1A7.Ala.15  | QGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTAYLELS   |
| 1A7.Ala.16  | QGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTAYLELS   |
| 3C8         | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADKSSSTAYMQLS |
| 3C8.gr.1    | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITRDTSTAYLELS   |
| 3C8.gr.2    | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADTSTAYLELS   |
| 3C8.gr.3    | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADTSTAYLELS   |
| 3C8.gr.4    | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADTSTAYLELS   |
| 3C8.gr.5    | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADTSTAYLELS   |
| 3C8.gr.5.DA | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITRDTSTAYLELS   |
| 3C8.gr.5.DQ | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITRDTSTAYLELS   |
| 3C8.gr.5.SG | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITRDTSTAYLELS   |
| 3C8.gr.5.EG | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADTSTAYLELS   |
| 3C8.gr.5.QG | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADTSTAYLELS   |
| 3C8.gr.6    | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADTSTAYLELS   |
| 3C8.gr.7    | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADTSTAYLELS   |
| 3C8.gr.8    | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITRDTSTAYLELS   |
| 3C8.gr.9    | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITRDTSTAYLELS   |
| 3C8.gr.10   | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITRDTSTAYLELS   |
| 3C8.gr.11   | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITRDTSTAYLELS   |
| 3C8.A.1     | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADTSTAYLELS   |
| 3C8.A.2     | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADTSTAYLELS   |
| 3C8.A.3     | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADTSTAYLELS   |
| 3C8.A.4     | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADTSTAYLELS   |
| 3C8.A.5     | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADTSTAYLELS   |
| 3C8.A.6     | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADTSTAYLELS   |
| 3C8.A.7     | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADTSTAYLELS   |
| 3C8.A.8     | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADTSTAYLELS   |
| 3C8.A.9     | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADTSTAYLELS   |
| 3C8.A.10    | QGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGKVTITADTSTAYLELS   |
| 1D2         | KGLEWLGMIW.SGGTIDYNAAFISRLSINKDNSKQVFFKMN  |
| 1D2.gr.1    | KGLEWIGMIW.SGGTIDYNAAFISRVTSVDTSKNQFSLKLS  |
| 1D2.gr.2    | KGLEWIGMIW.SGGTIDYNAAFISRVTSKDTSKNQVSLKLS  |
| 1D2.gr.3    | KGLEWLGMIW.SGGTIDYNAAFISRLTISKDTSKNQVSLKLS |

|                 |                                    |
|-----------------|------------------------------------|
| Número de Kabat | CDR1H - Contexto                   |
| 1A7             | 666633                             |
| 1A7.gr.1        | CDR1H - Kabat                      |
| 1A7.gr.2        | SLTSEDSAVYYCYCVLAPRWYFSVWGQGLVTVSS |
| 1A7.gr.3        | SLRSEDTAVYYCYVLAAPRWYFSVWGQGLVTVSS |
| 1A7.gr.4        | SLRSEDTAVYYCYVLAAPRWYFSVWGQGLVTVSS |
| 1A7.gr.5        | SLRSEDTAVYYCYVLAAPRWYFSVWGQGLVTVSS |
| 1A7.gr.6        | SLRSEDTAVYYCYVLAAPRWYFSVWGQGLVTVSS |
| 1A7.gr.7        | SLRSEDTAVYYCYVLAAPRWYFSVWGQGLVTVSS |

FIG. 11G

1A7.gr.DA SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.gr.ES SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.gr.NADS SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.gr.NADA SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.gr.NGDA SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.gr.SGDS SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.gr.NGSS SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.gr.DANADA SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.Ala.1 SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.Ala.2 SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.Ala.3 SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.Ala.4 SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.Ala.5 SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.Ala.6 SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.Ala.7 SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.Ala.8 SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.Ala.9 SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.Ala.10 SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.Ala.11 SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.Ala.12 SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.Ala.13 SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.Ala.14 SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.Ala.15 SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 1A7.Ala.16 SLRSEDT AVYYCVL APRWYF SVWGQGT L V TVSS  
 3C8 SLTSEDS AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.gr.1 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.gr.2 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.gr.3 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.gr.4 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.gr.5 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.gr.5.DA SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.gr.5.DQ SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.gr.5.SG SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.gr.5.EG SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.gr.5.QG SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.gr.6 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.gr.7 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.gr.8 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.gr.9 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.gr.10 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.gr.11 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.A.1 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.A.2 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.A.3 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.A.4 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.A.5 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.A.6 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.A.7 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.A.8 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.A.9 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS  
 3C8.A.10 SLRSEDT AVYFCARDRL... DYWGQGT L TVSS

FIG. 11H

1D2 S L Q V D D T A I Y Y C V R E E M . . . D Y W G Q Q G T S V T V S S  
1D2.gr.1 S V T A A D T A V Y Y C V R E E M . . . D Y W G Q Q G T L V T V S S  
1D2.gr.2 S V T A A D T A V Y Y C V R E E M . . . D Y W G Q Q G T L V T V S S  
1D2.gr.3 S V T A A D T A V Y Y C V R E E M . . . D Y W G Q Q G T L V T V S S

FIG. 11I

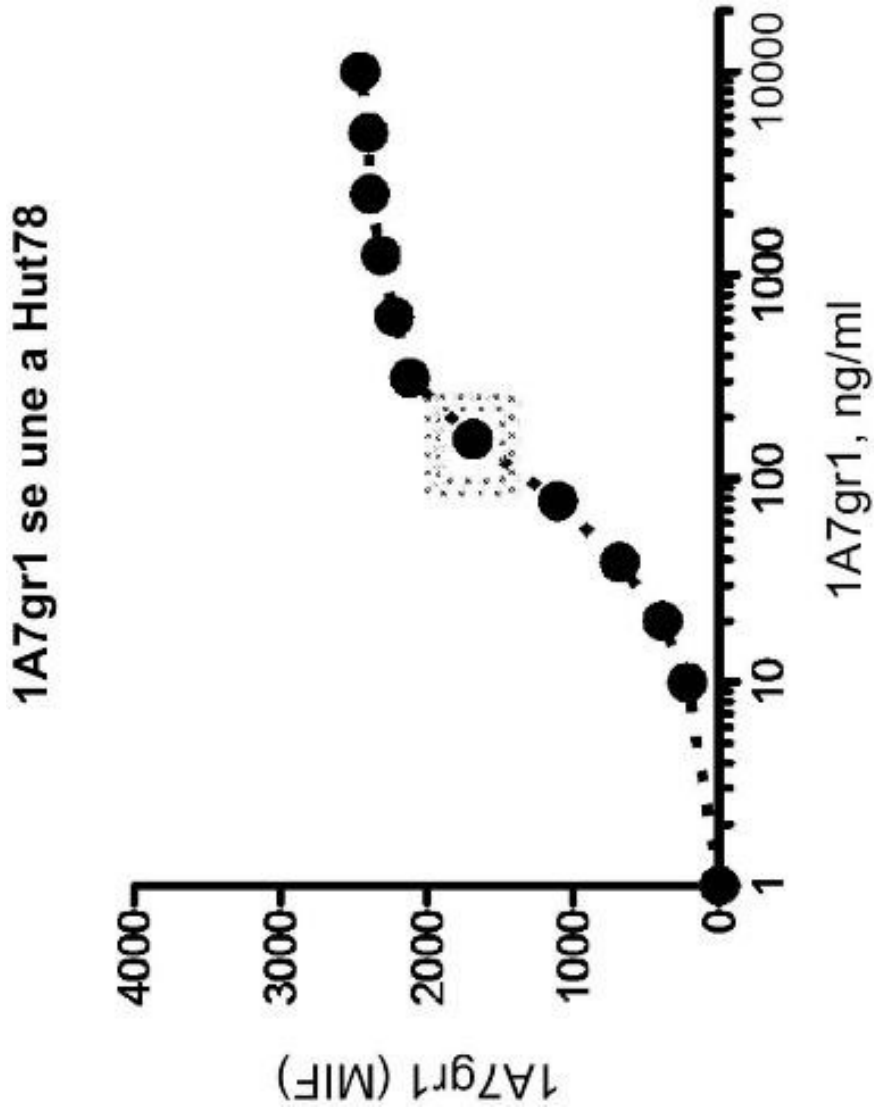
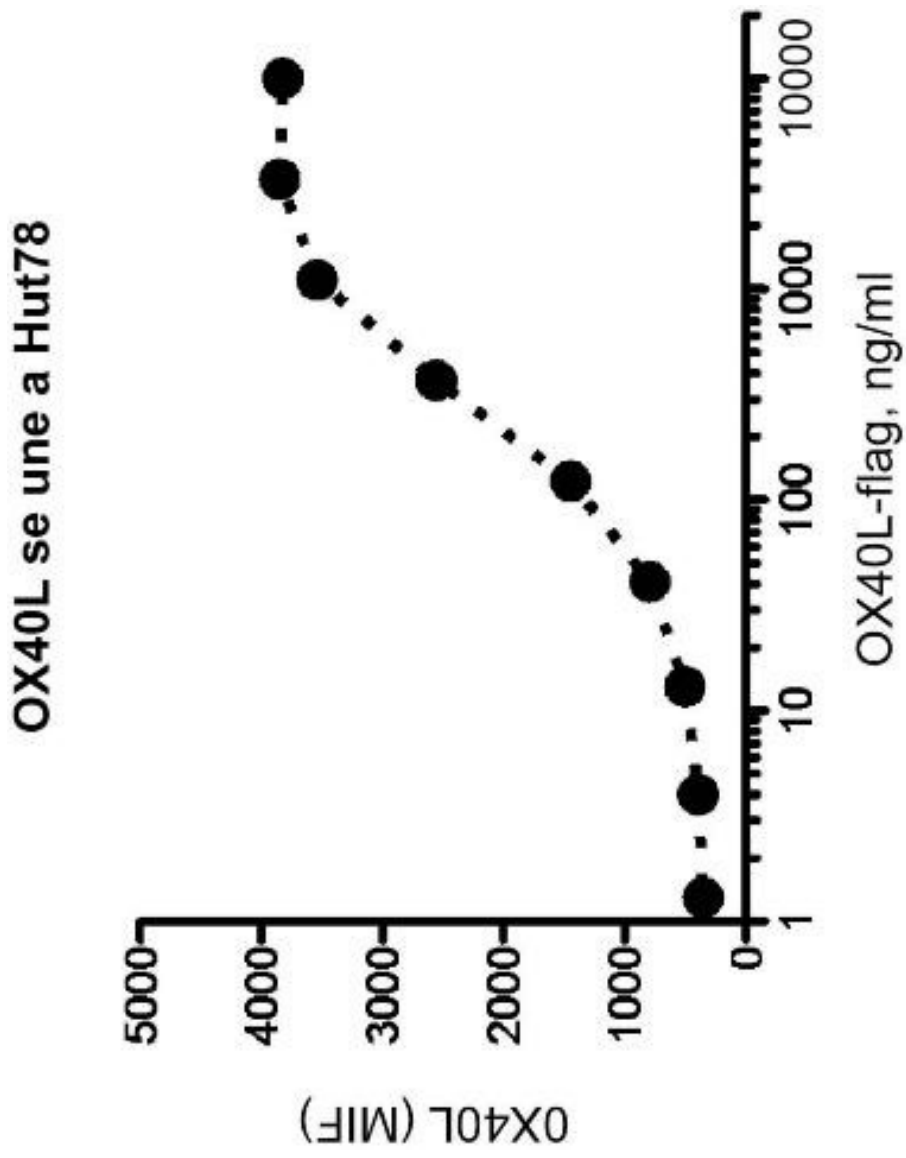


FIG. 12A





**FIG. 12B**

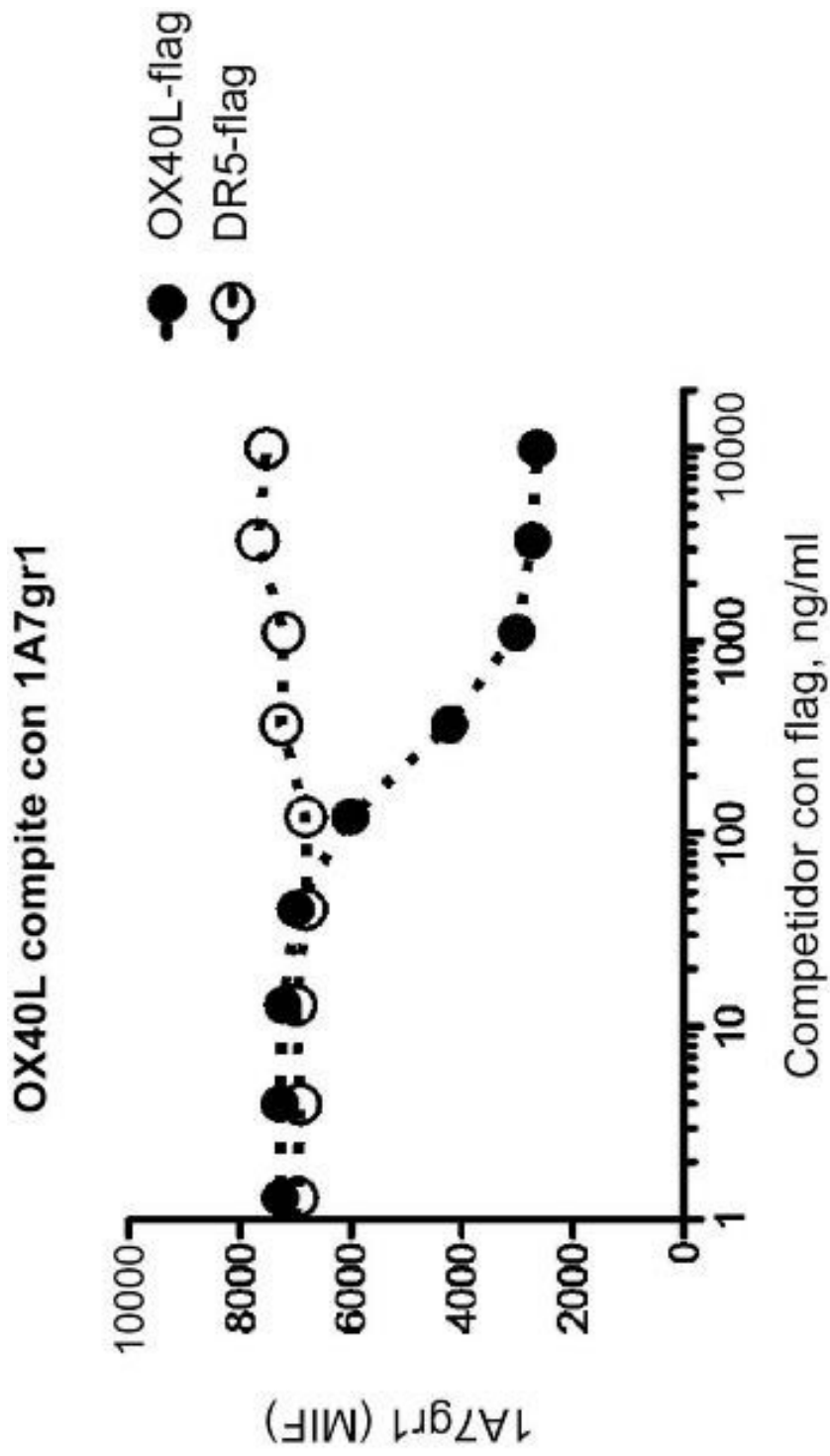
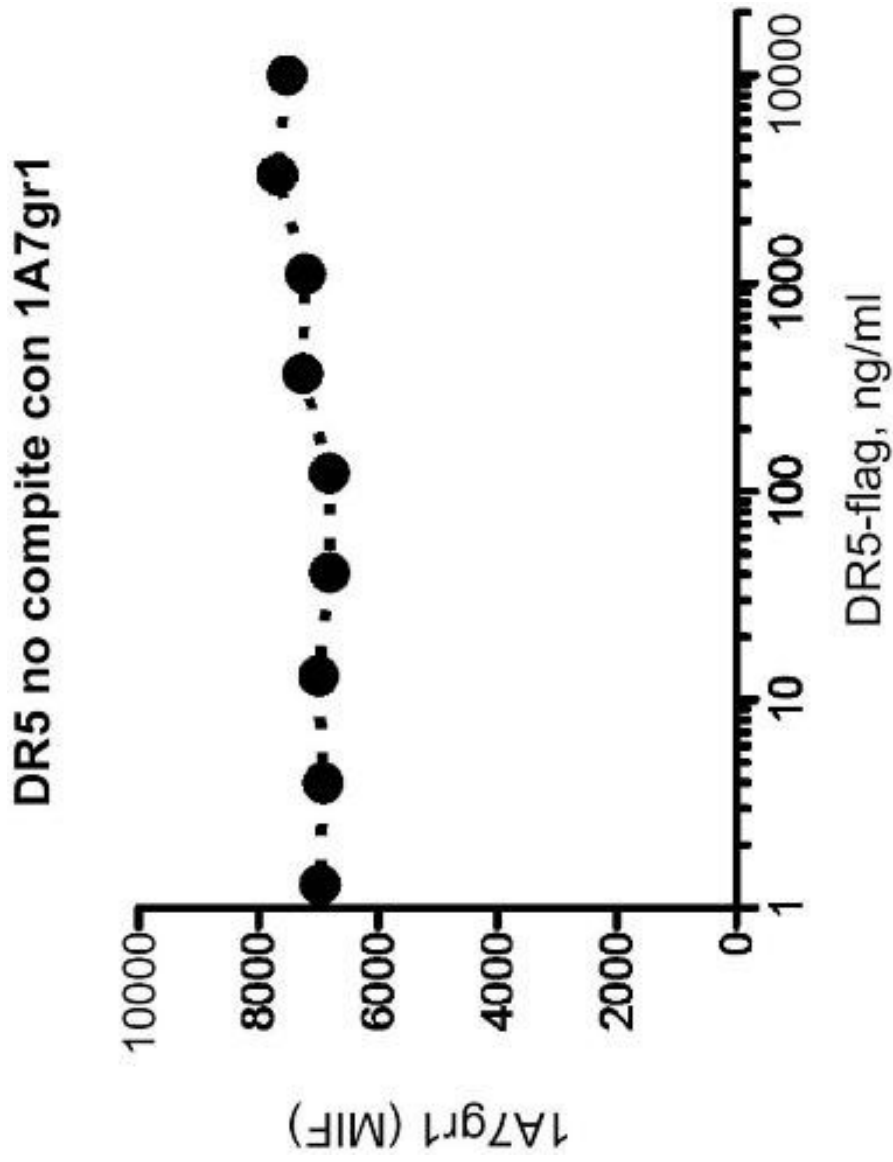


FIG. 12C



**FIG.12D**

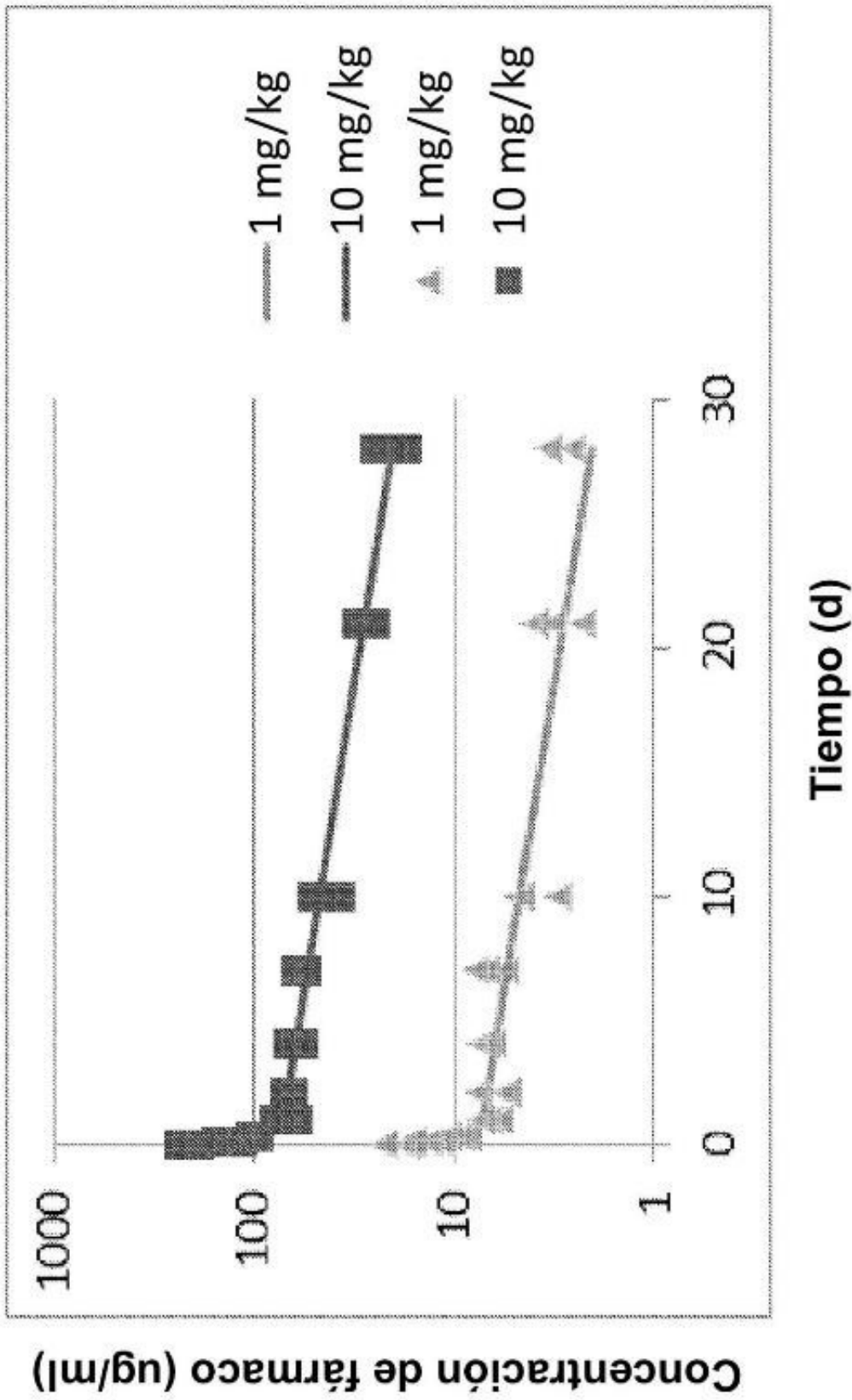


FIG. 13

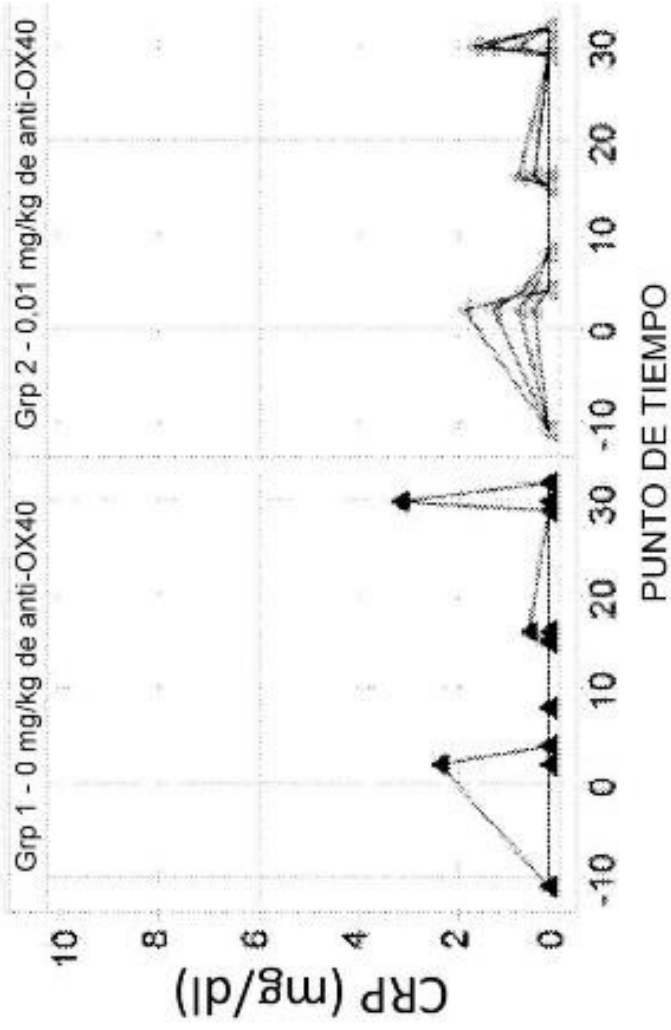


FIG. 14A

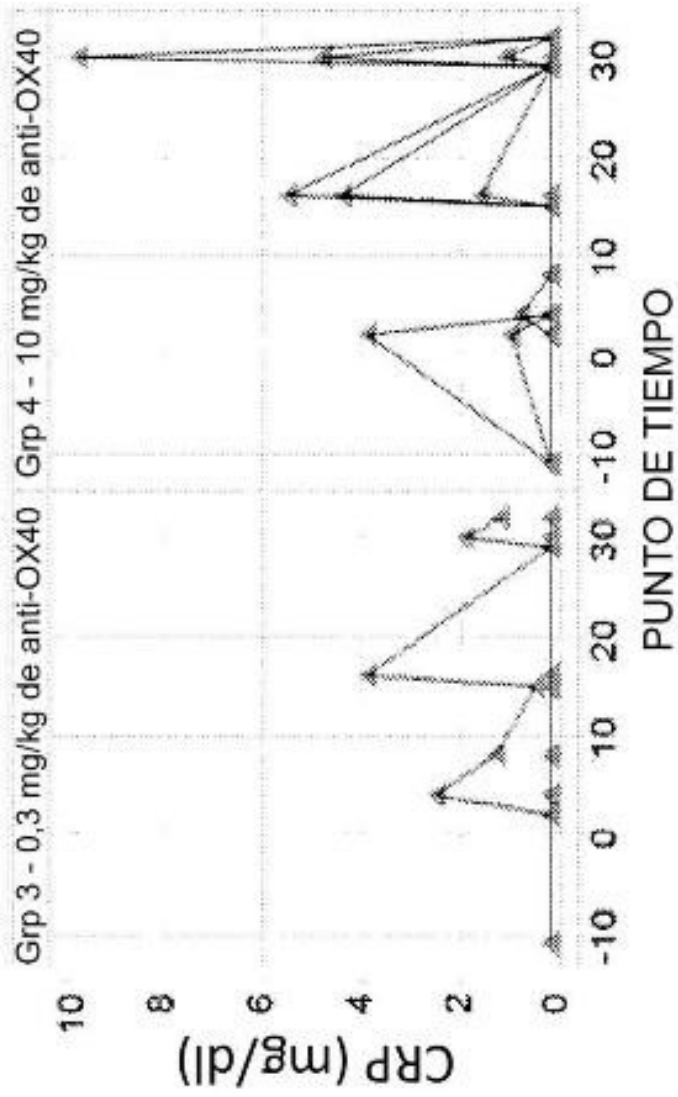
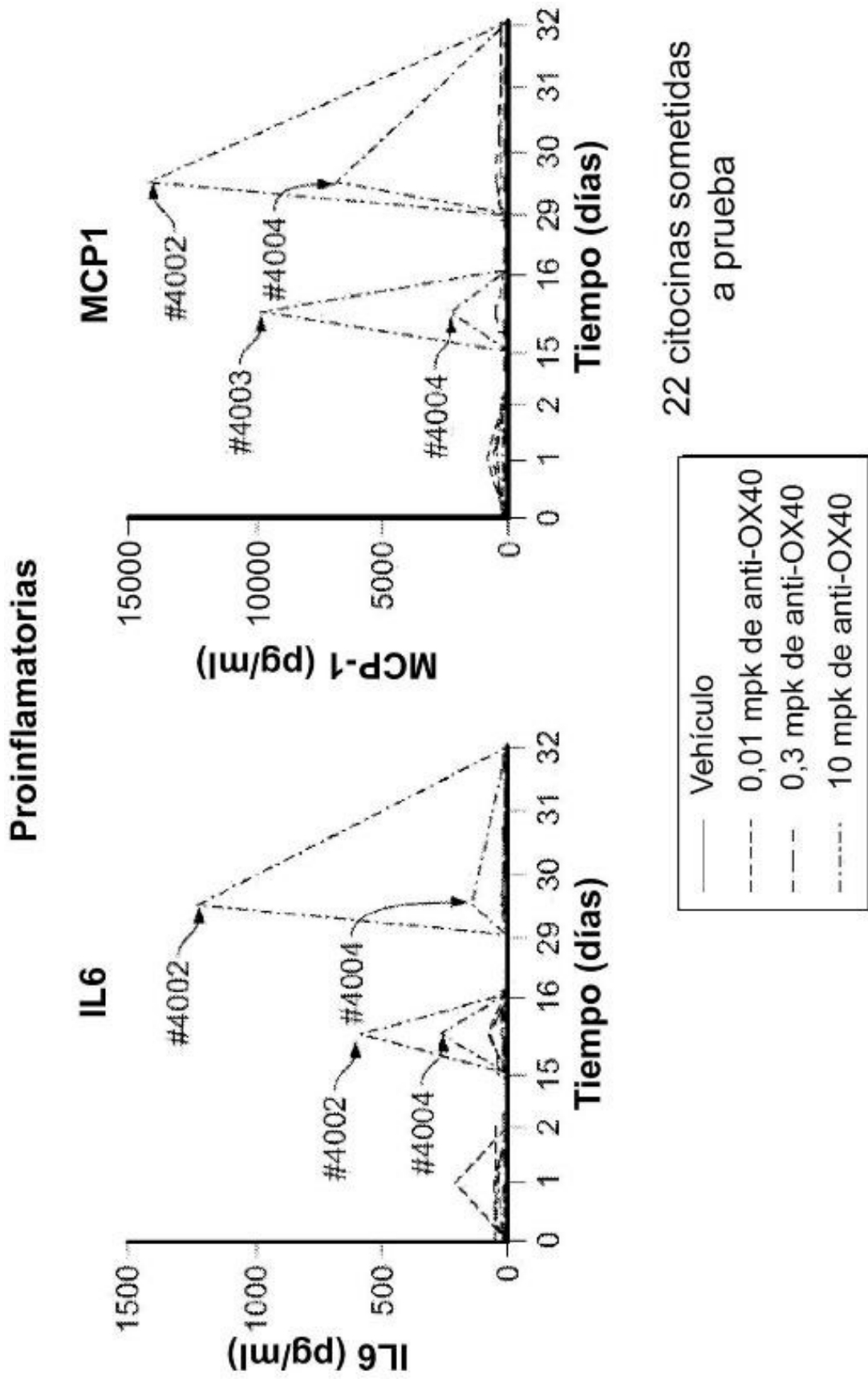
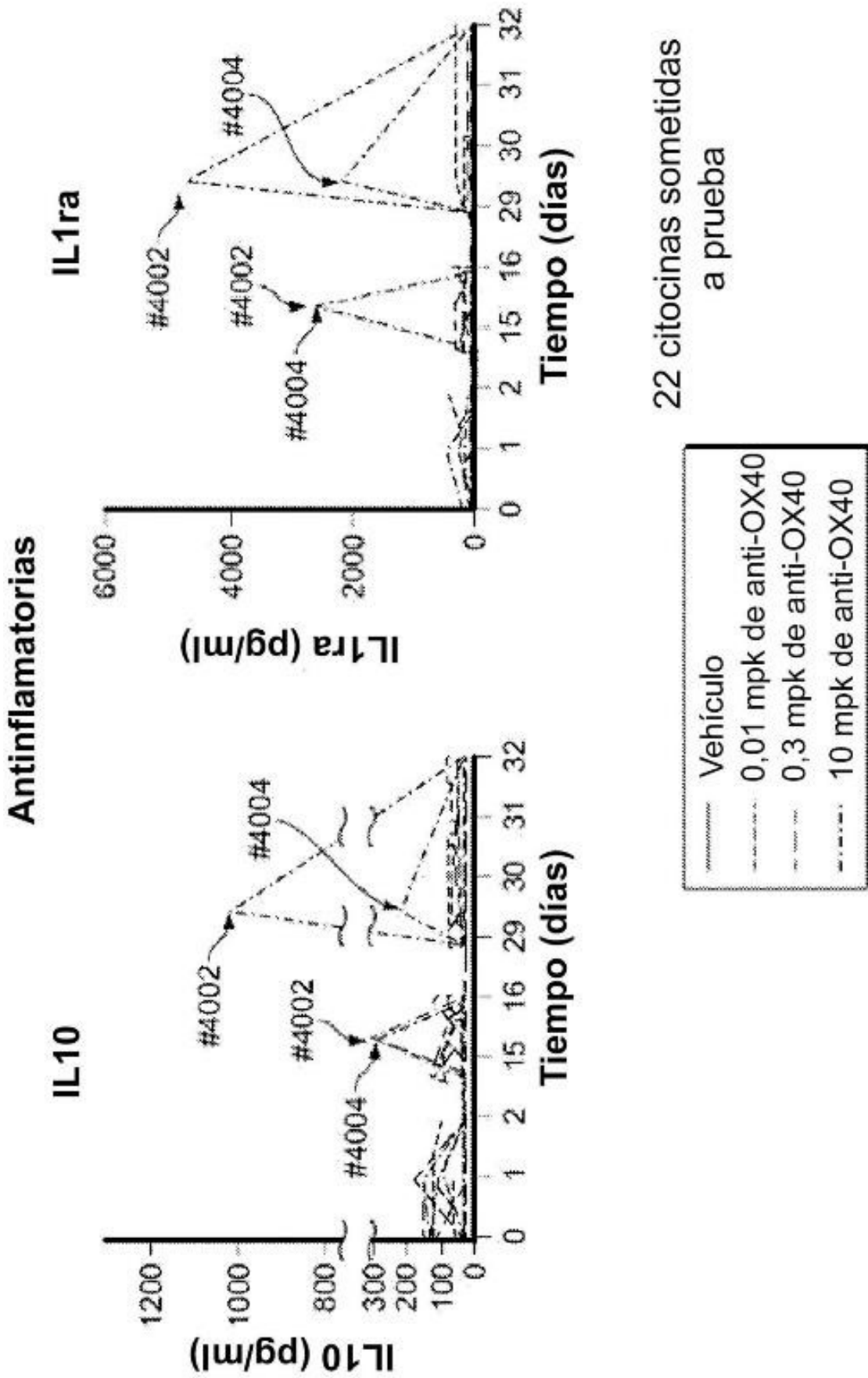


FIG. 14B



**FIG. 15A**



**FIG. 15B**



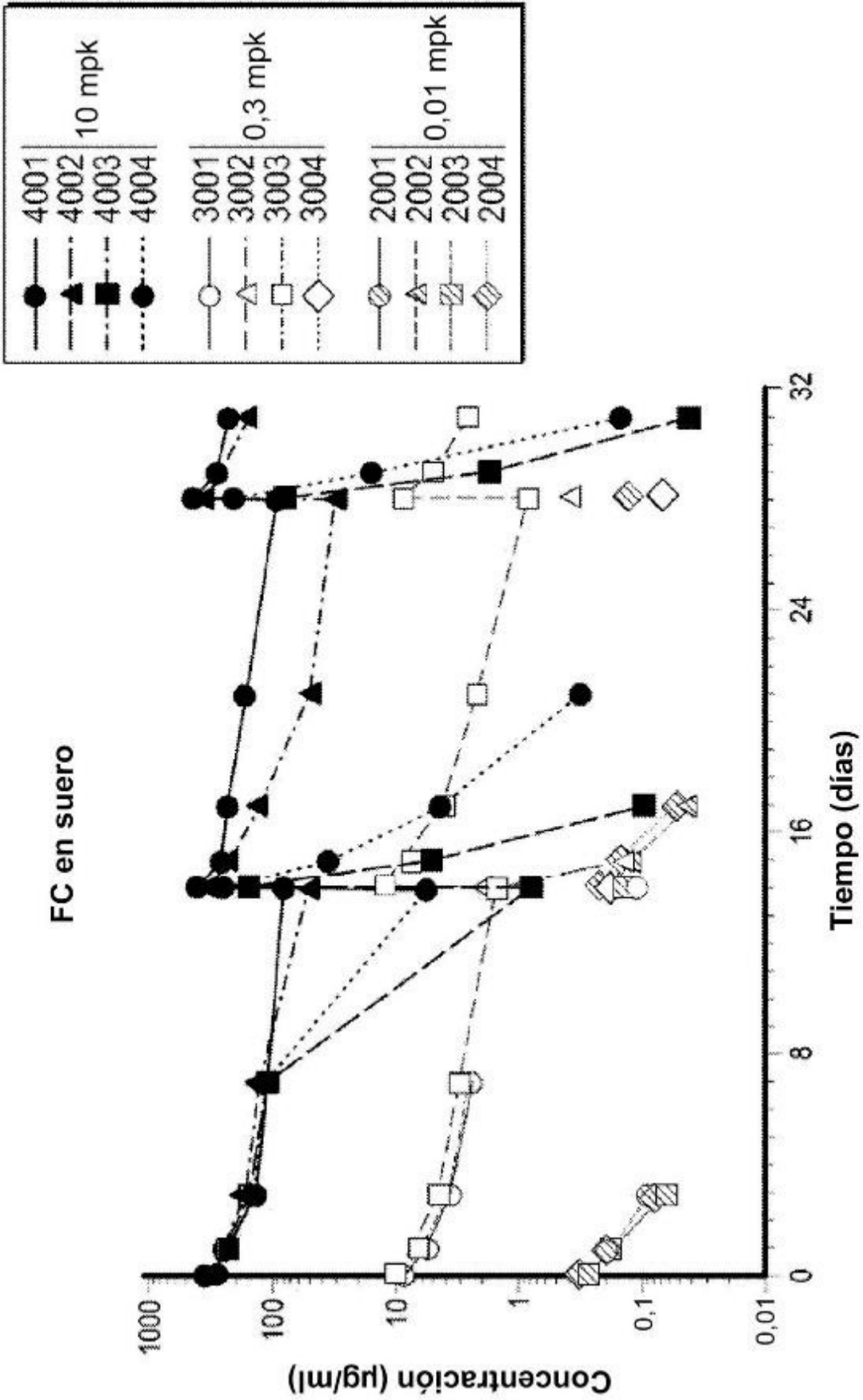


FIG. 16A

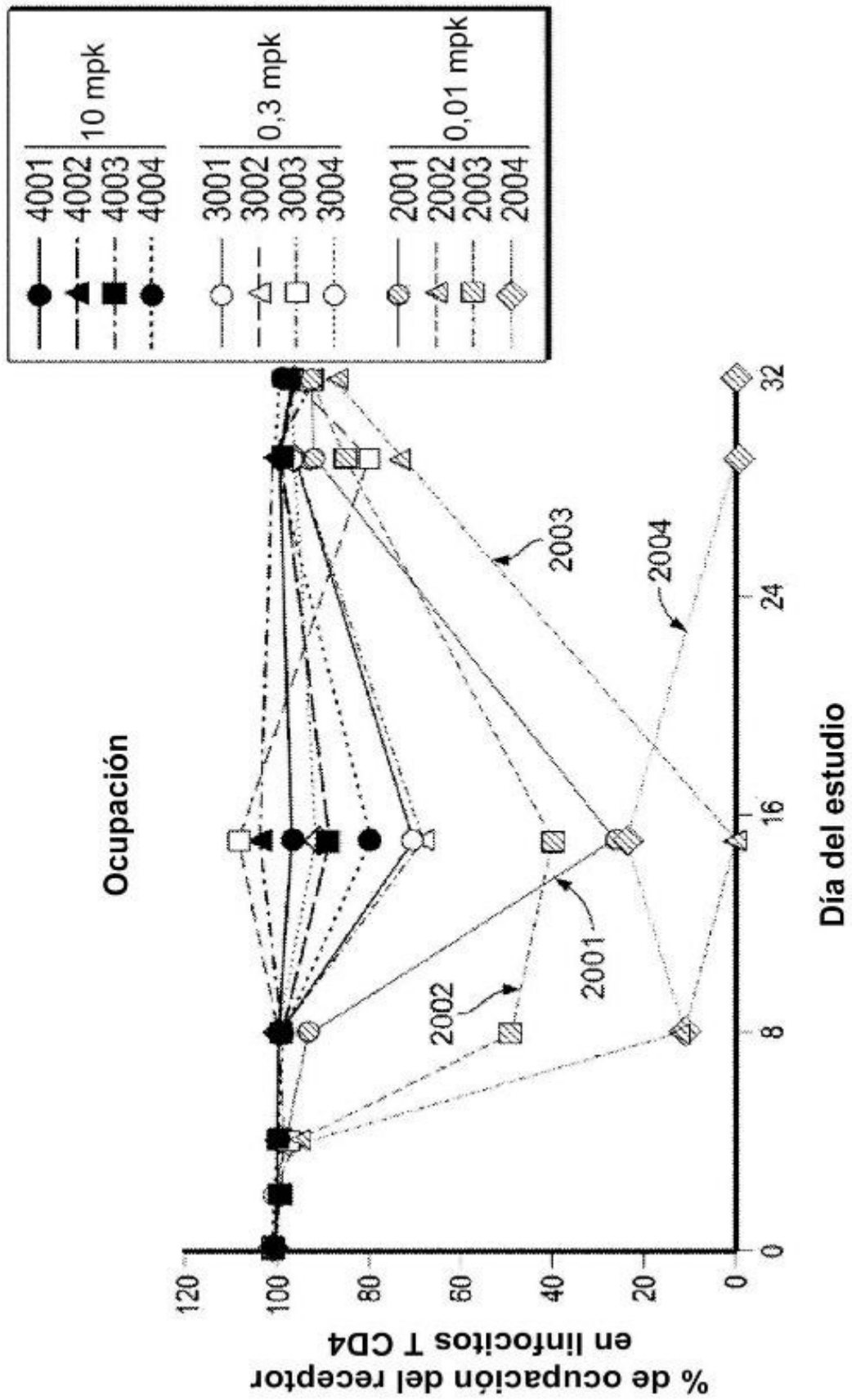


FIG. 16B

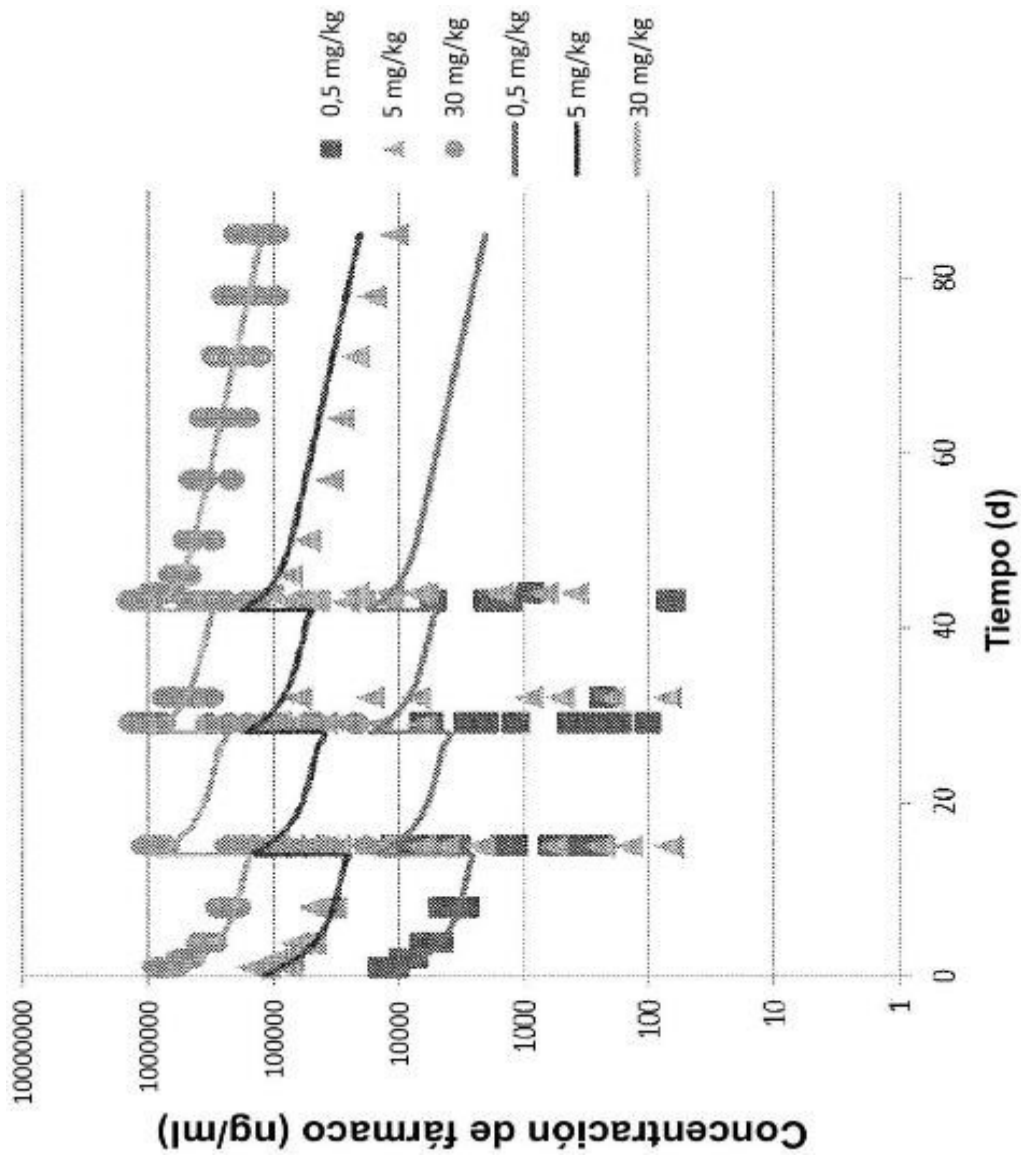


FIG. 17

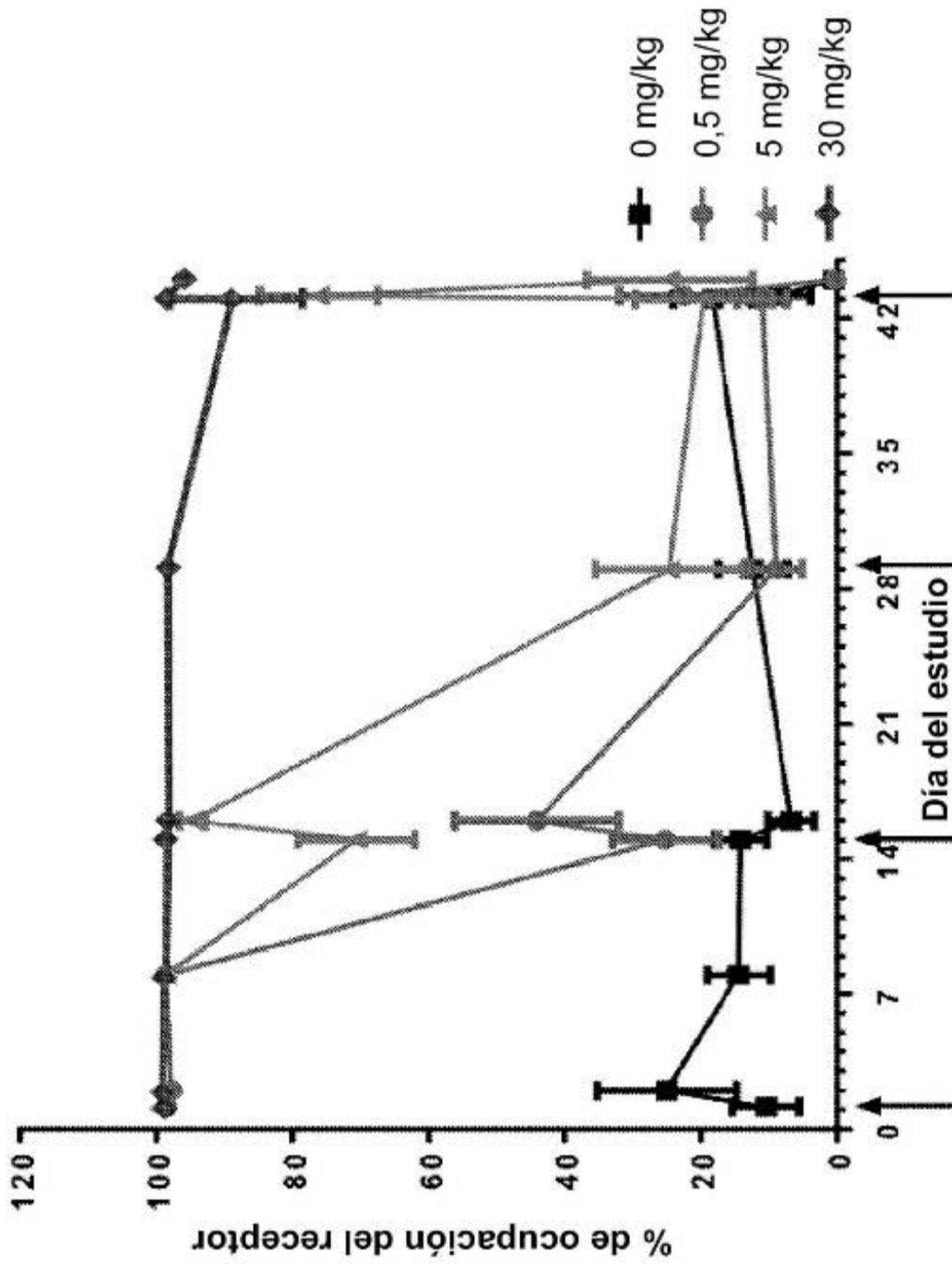


FIG. 18

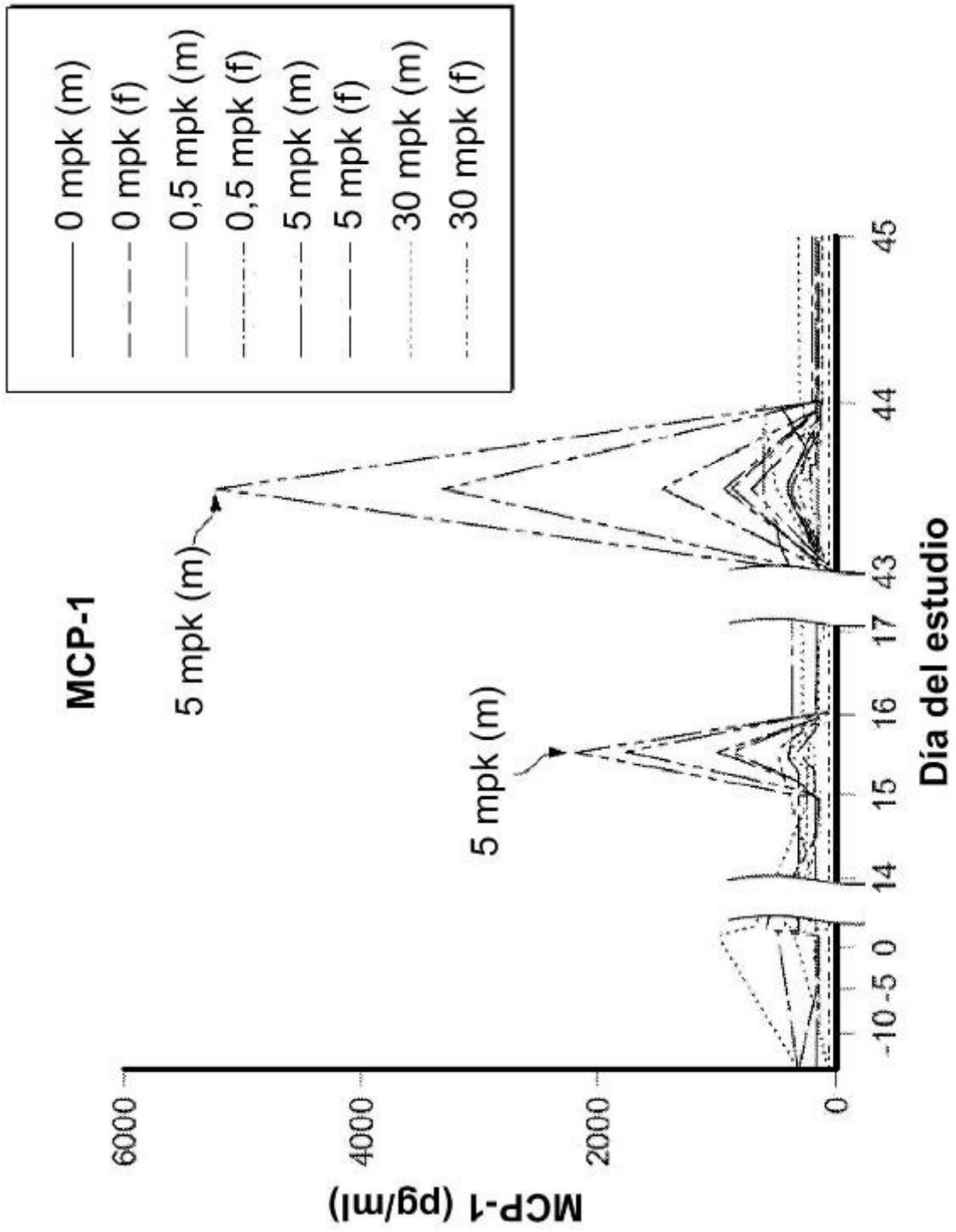


FIG. 19

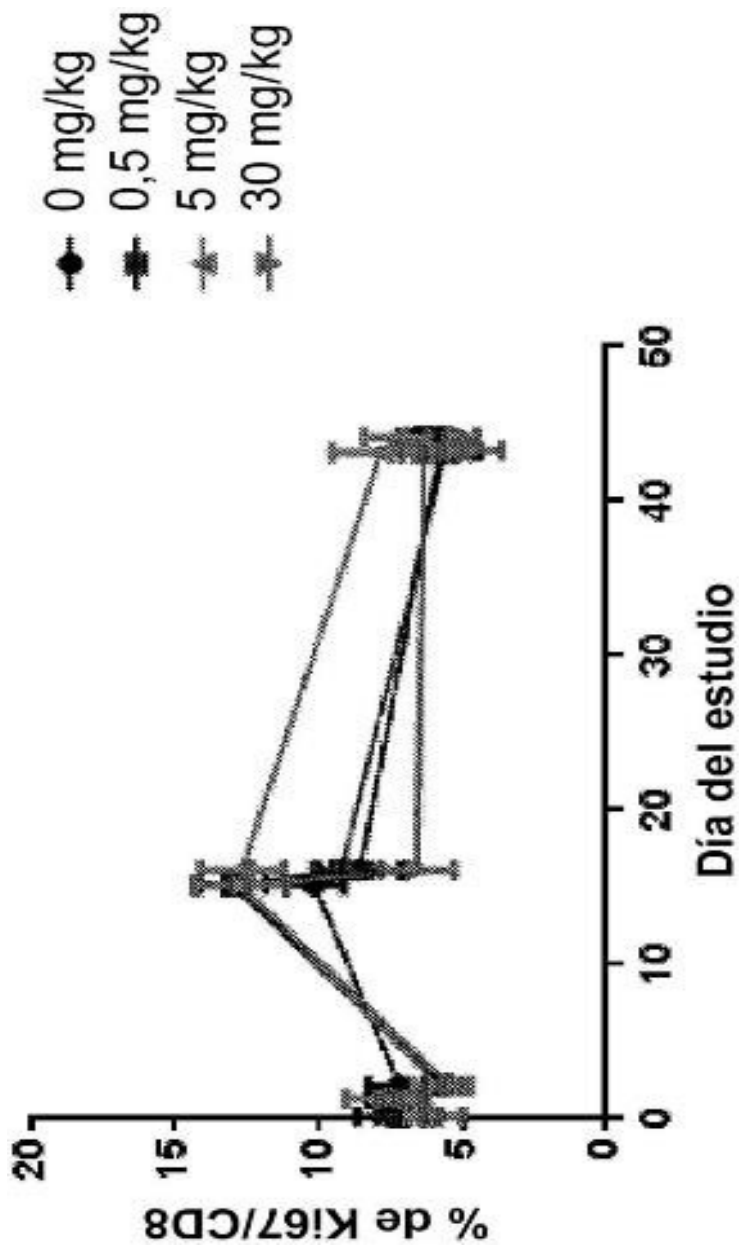


FIG. 20