

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 869**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2010 E 15196341 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3023438**

54 Título: **Anticuerpos anti-GITR**

30 Prioridad:

03.09.2009 US 239667 P

24.02.2010 US 307767 P

15.03.2010 US 313955 P

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

23.10.2020

73 Titular/es:

MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)

126 East Lincoln Avenue

Rahway, NJ 07065-0907 , US

72 Inventor/es:

SCHEBYE, XIAO MIN;

ERMAKOV, GRIGORI P.;

HODGES, DOUGLAS, J. y

PRESTA, LEONARD, G.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 788 869 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-GITR

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a anticuerpos específicos para el receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITR) y usos de los mismos. De manera más específica, la invención se refiere a anticuerpos humanizados que reconocen GITR humano y modulan su actividad, en particular en trastornos inmunitarios y proliferativos.

Antecedentes de la invención

La proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides (GITR), un miembro de la superfamilia TNFR, se expresa en muchos componentes del sistema inmunitario innato y adaptativo (véase, p. ej., Hanabuchi *et al.* (2006) *Blood* 107: 3617-3623; y Nocentini y Riccardi (2005) *Eur. J. Immunol.* 2005. 35: 1016-1022). Su expresión de membrana aumenta después de la activación de linfocitos T (Hanabuchi, mencionado anteriormente; y Nocentini y Riccardi, mencionado anteriormente); su activación activa conjuntamente los linfocitos T efectores y modula la actividad de los linfocitos T reguladores (Treg) (véase, p. ej., McHugh, *et al.* (2002) *Immunity* 2002. 16: 311-323; Shimizu, *et al.* (2002) *Nat. Immunol.* 3: 135-142; Ronchetti, *et al.* (2004) *Eur. J. Immunol.* 34: 613-622; y Tone, *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 15059-15064).

GITR es activado por el ligando de GITR (GITRL), que se expresa principalmente en APC y se ha sugerido que suministra señales por su dominio citoplasmático, aunque son necesarios estudios adicionales para definir la señalización bioquímica (Nocentini, mencionado anteriormente; Ronchetti, mencionado anteriormente; Suvas, *et al.* (2005) *J. Virol.* 79: 11935-11942; y Shin, *et al.* (2002) *Cytokine* 19:187-192).

La activación de GITR aumenta la resistencia a tumores e infecciones víricas, está implicada en procesos autoinmunitarios/inflamatorios y regula la extravasación de leucocitos (Nocentini, mencionado anteriormente; Cuzzocrea, *et al.* (2004) *J. Leukoc. Biol.* 76: 933-940; Shevach *et al.* (2006) *Nat. Rev. Immunol.* 6: 613-618; Cuzzocrea, *et al.* (2006) *J. Immunol.* 177: 631-641; y Cuzzocrea *et al.* (2007) *FASEB J.* 21: 117-129).

Se ha informado de moléculas que se unen a GITR en linfocitos T y células dendríticas (documento US 2007/098719 A1).

La activación génica relacionada con la familia del receptor de TNF inducida por glucocorticoides supera la tolerancia/ignorancia a antígenos de diferenciación de melanoma y mejora la inmunidad antitumoral (Ramirez-Montagut, *et al.* (2006) *J Immunol.* 176: 6434-6442).

El anticuerpo agonista anti-GITR mejora las respuestas de linfocitos T CD8+ inducidas por vacuna y la inmunidad tumoral (Cohen, *et al.* (2006) *Cancer Res.* 66: 4904-4912).

Se ha informado del tratamiento de tumores avanzados con mAb agonista anti-GITR y sus efectos sobre linfocitos T reguladores Foxp3+CD25+CD4+ infiltrantes de tumores (Ko, *et al.* (2005) *JEM* 215: 885-891).

Existe la necesidad de mejores métodos y composiciones para el tratamiento de trastornos inmunitarios y proliferativos, p. ej., tumores y cánceres, mediante el uso de agentes que modulan la actividad de GITR. Preferentemente, dichos agonistas tendrían alta afinidad por la molécula diana y podrían estimular la señalización de GITR a dosis relativamente bajas. Preferentemente, dichos métodos y composiciones serían muy específicos para GITR y no interferirían con la actividad de otros receptores. Preferentemente, dichos métodos y composiciones emplearían agonistas adecuados para la modificación para la administración de cargas útiles citotóxicas a células diana, pero también adecuados para usos no citotóxicos. Preferentemente, dichos métodos y composiciones emplearían anticuerpos modificados para limitar su antigenicidad cuando se administran a un sujeto que lo necesite.

55 Breve descripción del dibujo

La figura 1 muestra el efecto sinérgico del tratamiento combinado con DTA-1 (específico para mGITR; véase, p. ej., Shimizu, *et al.* (2002) *Nature Immunol.* 3: 135-142) e irradiación local. "RC" significa regresión completa.

La figura 2 muestra los módulos de GITR según lo determinado por el método descrito en Naismith y Sprang (1998) *Trends Biochem. Sci.* 23: 74-79. Los restos en negrita indican el epítipo conformacional de tipo DTA-1 como se determina a continuación.

Sumario de la invención

65 La presente invención satisface estas necesidades en la técnica y más al proporcionar agonistas de GITR en forma de anticuerpos monoclonales anti-GITR humanizados.

Se describen en el presente documento compuestos de unión, tales como un anticuerpo o fragmento del mismo, incluyendo anticuerpos recombinantes humanizados o quiméricos, que se unen a GITR humano, que comprenden un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene al menos una o más CDR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 56-88 y un dominio variable de cadena pesada, que tiene al menos una o más CDR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 23-55.

Como se describe en el presente documento, el compuesto de unión comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, descritos en los dos párrafos anteriores.

En algunas realizaciones, el compuesto de unión comprende una región marco conservada, en donde la secuencia de aminoácidos de la región marco conservada es la totalidad o sustancialmente la totalidad de una secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina humana.

El dominio variable de cadena ligera descrito en el presente documento comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12-22 o una variante de la misma. El dominio variable de cadena pesada descrito en el presente documento comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-11. El compuesto de unión descrito en el presente documento comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, descrito en este párrafo.

En otras realizaciones, el compuesto de unión de la presente invención comprende un dominio variable de cadena ligera, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 105 y un dominio variable de cadena pesada, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 104.

Se describen en el presente documento anticuerpos que pueden bloquear la unión de un compuesto de unión de la presente invención a GITR humano en un ensayo de bloqueo cruzado. El anticuerpo descrito en el presente documento puede bloquear la unión de GITR humano con un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR de los anticuerpos 36E5, 3D6, 61G6, 6H6, 61F6, 1D8, 17F10, 35D8, 49A1, 9E5 o 31H6 como se desvela en el presente documento. Se describen en el presente documento compuestos de unión que pueden bloquear la actividad mediada por GITR, incluyendo dichas actividades, pero sin limitación, la coestimulación del ensayo de proliferación de linfocitos T CD4+ vírgenes.

En algunas realizaciones, el compuesto de unión de la presente invención comprende además una región constante de cadena pesada, en donde la región constante de cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada humana γ 1 o γ 4 o una variante de la misma. En diversas realizaciones, la región constante de cadena ligera comprende una región constante de cadena ligera humana λ o κ .

En diversas realizaciones, los compuestos de unión de la presente invención son anticuerpos monoclonales, humanizados, o fragmentos de los mismos. La presente invención también contempla que el fragmento de unión a antígeno sea un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂ y un diacuerpo.

La presente invención abarca un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a GITR humano para su uso en un método para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto humano. El anticuerpo específico para GITR es el anticuerpo humanizado. En realizaciones adicionales, la respuesta inmunitaria es una respuesta antiinfecciosa o antivírica. En determinadas realizaciones, el anticuerpo de GITR o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra conjuntamente con un anticuerpo de TGF β o radiación local.

La presente invención abarca un ácido nucleico aislado que codifica la secuencia polipeptídica de una realización de anticuerpo del compuesto de unión de la presente invención. El ácido nucleico puede estar en un vector de expresión unido operativamente con secuencias de control reconocidas por una célula hospedadora transfectada con el vector. También se incluye una célula hospedadora que comprende el vector y un método para producir un polipéptido que comprende cultivar la célula hospedadora en condiciones en donde se expresa la secuencia de ácido nucleico, produciendo de este modo el polipéptido, y recuperar el polipéptido de la célula hospedadora o el medio.

La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, producido por un hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), en donde el hibridoma es PTA-9890.

La presente invención abarca un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une con la proteína GITR humana, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno reconoce un epítipo que abarca el módulo 3 y el módulo 4 de la proteína GITR humana (SEQ ID NO: 89). En determinadas realizaciones, el epítipo comprende Gly⁵⁷, Arg⁶⁵, Su⁶⁷, Lys⁸⁰, Phe⁸¹, Ser⁸² y Gln⁸⁶. Se describen en el presente documento anticuerpos que bloquean de

manera cruzada al menos uno de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos producidos por los hibridomas seleccionados del grupo que consiste en PTA-9889, PTA-9890, PTA-9891, PTA-9892, PTA-9893, PTA-10286, PTA-10287, PTA-10288, PTA-10289, PTA-10290 y PTA-10291.

5 Descripción detallada

Como se usa en el presente documento, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de palabras tales como "un", "uno", "el" y "la" incluyen sus referencias plurales correspondientes a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. La tabla 15 a continuación proporciona un listado de identificadores de secuencia usados en la presente solicitud.

I. Definiciones

Las expresiones "GITR", "proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides", "receptor de la familia TNFR inducible por activación", "AITR", "miembro 18 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral" y "TNFSF18" son bien conocidos en la técnica. Las secuencias de nucleótidos y polipeptídica de GITR humano y de ratón se desvelan en el documento WO 98/06842. También están disponibles depósitos de GenBank® de la secuencia de aminoácidos de GITR humana (Q9Y5U5) y las secuencias de aminoácidos y nucleicas de GITR de ratón (AF109216).

La "actividad proliferativa" abarca una actividad que promueve, que es necesario para o que está específicamente asociada a, p. ej., la división celular normal, así como cáncer, tumores, displasia, transformación celular, metástasis y angiogénesis.

La "administración" y el "tratamiento", como se aplica a un animal, ser humano, sujeto experimental, célula, tejido, órgano o líquido biológico, se refiere al contacto de un producto farmacéutico exógeno, producto terapéutico, agente de diagnóstico o composición para el animal, ser humano, sujeto, célula, tejido, órgano o líquido biológico. La "administración" y el "tratamiento" pueden referirse, p. ej., a métodos terapéuticos, farmacocinéticos, diagnósticos, de investigación y experimentales. El tratamiento de una célula abarca el contacto de un reactivo con la célula, así como el contacto de un reactivo con un líquido, donde el líquido está en contacto con la célula. La "administración" y el "tratamiento" también significa tratamientos *in vitro* y *ex vivo*, p. ej., de una célula, mediante un reactivo, diagnóstico, composición de unión o mediante otra célula. El "tratamiento", como se aplica a un sujeto humano, veterinario o de investigación, se refiere a tratamiento terapéutico, medidas profilácticas o preventivas, a aplicaciones de investigación y diagnóstico. El "tratamiento" como se aplica a un sujeto humano, veterinario o de investigación, o célula, tejido u órgano, abarca el contacto de un agente con un sujeto animal, una célula, tejido, compartimento fisiológico o líquido fisiológico. El "tratamiento de una célula" también abarca situaciones en las que el agente entra en contacto con GITR, p. ej., en fase fluida o fase coloidal, pero también situaciones en las que el agonista o antagonista no entran en contacto con la célula o el receptor.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a cualquier forma de anticuerpo que presente la actividad biológica deseada. Por tanto, se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos completamente humanos, etc. siempre que presenten la actividad biológica deseada.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "fragmento de unión a GITR" "fragmento de unión del mismo" o "fragmento de unión a antígeno del mismo" abarcan un fragmento o un derivado de un anticuerpo que aún conserva sustancialmente su actividad biológica de inducir la señalización de GITR denominada en el presente documento "actividad inductora de GITR". La expresión "fragmento de anticuerpo" o fragmento de unión a GITR se refiere a una parte de un anticuerpo de longitud completa, en general la región de unión a antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias, p. ej., sc-Fv; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Normalmente, un fragmento de unión o derivado conserva al menos 10 % de su actividad agonista de GITR. Preferentemente, un fragmento de unión o derivado conserva al menos 25 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % (o más) de su actividad agonista de GITR, aunque cualquier fragmento de unión con suficiente afinidad para ejercer el efecto biológico deseado será útil. También se pretende que un fragmento de unión a GITR pueda incluir variantes que tengan sustituciones de aminoácidos conservadoras que no alteren sustancialmente su actividad biológica.

La expresión "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 salvo por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un único epítipo antigénico. Por el contrario, las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) normalmente incluyen una multitud de anticuerpos dirigidos contra (o específicos para) diferentes epítipos. El modificador "monoclonal" indica como la naturaleza del anticuerpo que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente

homogénea y no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante el método del hibridoma descrito por primera vez en Kohler *et al.* (1975) Nature 256: 495 o se pueden preparar mediante métodos de ADN recombinante (véase, p. ej., patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567). Los

5 "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas descritas en Clackson *et al.* (1991) Nature 352: 624-628 y Marks *et al.* (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597, por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las

10 secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de una especie en particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico a u homólogo de secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada. Patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567; Morrison *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855.

Un "anticuerpo de dominio" es un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional que contiene solamente la región variable de una cadena pesada o la región variable de una cadena ligera. En algunos casos, se unen covalentemente dos o más regiones V_H con un conector peptídico para crear un anticuerpo de dominio

20 bivalente. Las dos regiones V_H de un anticuerpo de dominio bivalente pueden dirigirse al mismo o a diferentes antígenos.

Un "anticuerpo bivalente" comprende dos sitios de unión a antígeno. En algunos casos, los dos sitios de unión tienen las mismas especificidades antigénicas. Sin embargo, los anticuerpos bivalentes pueden ser biespecíficos (véase

25 posteriormente).

Como se usa en el presente documento, la expresión anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" se refiere a fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpos, en donde estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. En general, el polipéptido de Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para unión a antígeno.

30 Para una revisión de los sFv, véase Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315.

Los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento también incluyen anticuerpos de dominio único camelizados. Véase, p. ej., Muyl-dermans *et al.* (2001) Trends Biochem. Sci. 26: 230; Reichmann *et al.* (1999) J. Immunol. Methods 231: 25; documento WO 94/04678; documento WO 94/25591; patente de los Estados Unidos n.º 6.005.079). Se describen en el presente documento anticuerpos de dominio único que comprenden dos dominios V_H con modificaciones tales que se formen anticuerpos de dominio único.

35

Como se usa en el presente documento, el término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L o V_L-V_H). Usando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Se describen diacuerpos de manera más completa en, p. ej., el documento EP 404.097; documento WO 93/11161; y Holliger *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448. Para una revisión de variantes de anticuerpos modificados por ingeniería genética véase, en general, Holliger y Hudson (2005) Nat. Biotechnol. 23: 1126-1136.

40

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) así como anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos contienen una secuencia mínima procedente de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. El prefijo "hum", "hu" o "h" se añade a las designaciones de clones de anticuerpos cuando sea necesario para distinguir los anticuerpos humanizados de anticuerpos de roedores precursores. Las formas humanizadas de anticuerpos de roedores comprenderán en general las mismas secuencias de CDR de los anticuerpos de roedores precursores, aunque se pueden incluir determinadas sustituciones de aminoácidos para aumentar la afinidad, aumentar la estabilidad del anticuerpo humanizado o por otras razones.

50

Los anticuerpos de la presente invención también incluyen anticuerpos con regiones Fc modificadas (o bloqueadas) para proporcionar funciones efectoras alteradas. Véase, p. ej., patente de los Estados Unidos n.º 5.624.821; documento WO2003/086310; documento WO2005/120571; documento WO2006/0057702; Presta (2006) Adv. Drug Delivery Rev. 58: 640-656. Dicha modificación se puede usar para mejorar o suprimir diversas reacciones del

65

sistema inmunitario, con posibles efectos beneficiosos en el diagnóstico y la terapia. Las alteraciones de la región Fc incluyen cambios de aminoácidos (sustituciones, supresiones e inserciones), glucosilación o desglucosilación, y adición de múltiples Fc. Los cambios en el Fc también pueden alterar la semivida de los anticuerpos en anticuerpos terapéuticos y una semivida más larga daría como resultado dosificación menos frecuente, con el consiguiente aumento de la comodidad y disminución del uso de material. Véase Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116: 731 en 734-35.

Los anticuerpos de la presente invención también incluyen anticuerpos con regiones Fc intactas que proporcionan funciones efectoras completas, p. ej., anticuerpos del isotipo IgG1, que inducen citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en una célula diana.

Los anticuerpos de la presente invención también incluyen anticuerpos conjugados con cargas útiles citotóxicas, tales como agentes citotóxicos o radionúclidos. Dichos conjugados de anticuerpos se pueden usar en inmunoterapia junto con tratamiento anti-GITR, para dirigirse selectivamente a y destruir células que expresan determinados antígenos en su superficie. Los agentes citotóxicos ilustrativos incluyen ricina, alcaloide de la vinca, metotrexato, exotoxina de *Pseudomonas*, saporina, toxina diftérica, cisplatino, doxorubicina, toxina abrina, gelonina y proteína antivírica de fitolaca. Los radionúclidos ilustrativos para su uso en inmunoterapia con los anticuerpos de la presente invención incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ⁹⁰Y, ⁶⁷Cu, ²¹¹At, ¹⁷⁷Lu, ¹⁴³Pr y ²¹³Bi. Véase, p. ej., publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2006/0014225.

La expresión "anticuerpo completamente humano" se refiere a un anticuerpo que comprende solo secuencias de proteína de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo completamente humano puede contener cadenas de carbohidratos murinos si se produce en un ratón, en una célula de ratón o en un hibridoma procedente de una célula de ratón. De manera similar, "anticuerpo de ratón" o "anticuerpo de rata" se refieren a un anticuerpo que comprende solo secuencias de inmunoglobulina de ratón o rata, respectivamente. Se puede generar un anticuerpo completamente humano en un ser humano, en un animal transgénico que tiene secuencias de línea germinal de inmunoglobulina humana, mediante presentación en fagos u otros métodos de biología molecular.

Como se usa en el presente documento, la expresión "región hipervariable" se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (p. ej., restos 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) y 89-97 (CDRL3) en el dominio variable de cadena ligera y restos 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) y 95-102 (CDRH3) en el dominio variable de cadena pesada (Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (p. ej., restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada (Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917)). Como se usa en el presente documento, la expresión restos de "marco conservado" o "FR" se refiere a los restos de dominio variable distintos de los restos de región hipervariable definidos en el presente documento como restos de CDR. La numeración de restos anterior se refiere al sistema de numeración de Kabat y no corresponde necesariamente en detalle a la numeración de secuencias en el listado de secuencias adjunto.

"Compuesto de unión" se refiere a una molécula, molécula pequeña, macromolécula, polipéptido, anticuerpo o fragmento o análogo de los mismos, o receptor soluble, capaz de unirse con una diana. "Compuesto de unión" también puede referirse a un complejo de moléculas, p. ej., un complejo no covalente, a una molécula ionizada y a una molécula modificada de manera covalente o no covalente, p. ej., modificada por fosforilación, acilación, reticulación, ciclación o escisión limitada, que es capaz de unirse con una diana. Cuando se usa en referencia a anticuerpos, la expresión "compuesto de unión" se refiere tanto a anticuerpos como a fragmentos de unión a antígeno de los mismos. "Unión" se refiere a una asociación de la composición de unión con una diana donde la asociación da como resultado reducción del movimiento browniano normal de la composición de unión, en casos en los que la composición de unión puede disolverse o suspenderse en solución. "Composición de unión" se refiere a una molécula, p. ej., un compuesto de unión, en combinación con un estabilizador, excipiente, sal, tampón, disolvente o aditivo, capaz de unirse con una diana.

"Variantes modificadas de manera conservadora" o "sustitución conservadora" se refiere a sustituciones de aminoácidos que son conocidas por los expertos en esta técnica y con frecuencia pueden realizarse incluso en regiones esenciales del polipéptido sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Dichas sustituciones ilustrativas se realizan preferentemente de acuerdo con las expuestas en la tabla 1 de la siguiente manera:

Tabla 1

Sustituciones de aminoácidos conservadoras ilustrativas	
Resto original	Sustitución conservadora
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys, His

(continuación)

Sustituciones de aminoácidos conservadoras ilustrativas	
Resto original	Sustitución conservadora
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

5 Los expertos en esta técnica reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido pueden no alterar sustancialmente la actividad biológica. Véase, p. ej., Watson *et al.* (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., págs. 224 (4ª edición).

10 La expresión "que consiste esencialmente en", o variaciones tales como "consisten esencialmente en" o "consistiendo esencialmente en", como se usan a lo largo la memoria descriptiva y las reivindicaciones, indican la inclusión de cualquier elemento o grupo de elementos enumerado y la inclusión opcional de otros elementos, de naturaleza similar o diferente a los elementos enumerados, que no cambian materialmente las propiedades básicas o novedosas del régimen de dosificación, método o composición especificado. Como ejemplo no limitante, un compuesto de unión que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos enumerada también puede incluir uno o más aminoácidos, incluyendo sustituciones de uno o más restos de aminoácidos, que no afectan materialmente a las propiedades del compuesto de unión.

15 La "cantidad eficaz" abarca una cantidad suficiente para aliviar o prevenir un síntoma o signo de la afección médica. La cantidad eficaz también significa una cantidad suficiente para permitir o facilitar el diagnóstico. Una cantidad eficaz para un paciente en particular o un sujeto veterinario puede variar dependiendo de factores tales como la afección que se trate, el estado de salud general del paciente, el método, la vía y la dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios. Véase, p. ej., patente de los Estados Unidos n.º 5.888.530. Una cantidad eficaz puede ser la dosis máxima o el protocolo de dosificación que evita efectos secundarios significativos o efectos tóxicos. El efecto dará como resultado una mejora de una medida o parámetro de diagnóstico en al menos 5 %, habitualmente en al menos 10 %, más habitualmente al menos 20 %, más habitualmente al menos 30 %, preferentemente al menos 40 %, más preferentemente al menos 50 %, más preferentemente al menos 60 %, 25 idealmente al menos 70 %, más idealmente al menos 80 % y lo más idealmente al menos 90 %, donde 100 % se define como el parámetro de diagnóstico mostrado por un sujeto normal. Véase, p. ej., Maynard *et al.* (1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Ratón, FL; Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., Londres, Reino Unido.

30 "Afección inmunitaria" o "trastorno inmunitario" abarca, p. ej., inflamación patológica, un trastorno inflamatorio y un trastorno o enfermedad autoinmunitario. "Afección inmunitaria" también se refiere a infecciones, infecciones persistentes y afecciones proliferativas, tales como cáncer, tumores y angiogénesis, incluyendo infecciones, tumores

y cánceres que resisten la erradicación por el sistema inmunitario. "Afección cancerosa" incluye, p. ej., cáncer, células cancerosas, tumores, angiogénesis y afecciones precancerosas tales como displasia.

5 La expresión trastorno inmunitario significa una enfermedad en la que un componente del sistema inmunitario de un mamífero provoca, media en o contribuye de otra manera a una morbilidad en el mamífero. También se incluyen enfermedades en las que la estimulación o intervención de la respuesta inmunitaria tiene un efecto de alivio sobre la progresión de la enfermedad. Se incluyen dentro de esta expresión enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias inmunomediadas, enfermedades inflamatorias no inmunomediadas, enfermedades infecciosas y enfermedades de inmunodeficiencia. Los ejemplos de enfermedades relacionadas con el sistema inflamatorio e inflamatorias, algunas de las cuales son inmunitarias o está mediadas por linfocitos T, que pueden tratarse según la invención incluyen lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis juvenil crónica, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (esclerodermia), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmunitaria (pancitopenia inmunitaria, hemoglobinuria paroxística nocturna), trombocitopenia autoinmunitaria (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia inmunomediada), tiroiditis (enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal inmunomediada (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central y periférico, tales como esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepato biliares tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis crónica activa autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa y colangitis esclerosante, enfermedades pulmonares inflamatorias y fibróticas tales como enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa: enfermedad de Crohn), celiacía y enfermedad de Whipple, dermatopatías autoinmunitarias o mediadas por el sistema inmunitario, incluyendo dermatopatías ampollas, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad alimentaria y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón tales como neumonías eosinofílicas, fibrosis pulmonar idiopática y alveolitis alérgica, enfermedades asociadas a trasplantes, incluyendo rechazo de injerto y enfermedad del injerto contra el hospedador. Las enfermedades infecciosas incluyen SIDA (infección por VIH), hepatitis A, B, C, D y E, infecciones bacterianas, infecciones fúngicas, infecciones protozoarias e infecciones parasitarias.

30 Los términos "cáncer", "tumor", "canceroso" y "maligno" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento celular desregulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma incluyendo adenocarcinoma, linfoma, blastoma, melanoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, 35 cáncer de pulmón no microcítico, cáncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, cáncer de páncreas, glioblastoma, glioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado tal como carcinoma hepático y hepatoma, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio, mieloma (tal como mieloma múltiple), carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón tal como carcinoma de células renales y tumores de Wilms, carcinoma de células basales, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de vulva, 40 cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer de esófago y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

A medida que las células cancerosas crecen y se multiplican, forman una masa de tejido canceroso, es decir, un tumor, que invade y destruye tejidos adyacentes normales. Los tumores malignos son cáncer. Los tumores malignos habitualmente se pueden extirpar, pero pueden volver a crecer. Las células de tumores malignos pueden invadir y 45 dañar tejidos y órganos cercanos. Además, las células cancerosas pueden desprenderse de un tumor maligno y entrar en el torrente sanguíneo o el sistema linfático, que es la forma en que las células cancerosas se propagan desde el tumor primario (es decir, el cáncer original) para formar nuevos tumores en otros órganos. La propagación del cáncer en el cuerpo se denomina metástasis (What You Need to Know About Cancer- an Overview, NIH Publication n.º 00-1566; publicado el 26 de septiembre de 2000, actualizado el 16 de septiembre de 2002 (2002)).

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "tumor sólido" se refiere a un crecimiento anómalo o masa de tejido que habitualmente no contiene quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos (no cancerosos) o malignos (cancerosos). Los diferentes tipos de tumores sólidos se nombran por el tipo de células que los forman. Son ejemplos de tumores sólidos sarcomas, carcinomas y linfomas. Las leucemias (cánceres de la sangre) generalmente no forman tumores sólidos (National Cancer Institute, Dictionary of Cancer Terms).

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "cáncer primario" se refiere al tumor original o al primer tumor. El cáncer puede comenzar en cualquier órgano o tejido del cuerpo. Habitualmente, se nombra por la parte del cuerpo o el tipo de célula en el que se origina (Metastatic Cancer: Questions and Answers, Cancer Facts 6.20, National Cancer Institute, revisado el 1 de septiembre de 2004 (2004)).

65 Como se usa en el presente documento, la expresión "carcinoma localizado" se refiere a células cancerosas que todavía están contenidas dentro del tejido donde comenzaron a crecer y que aún no se han vuelto invasivas o se han propagado a otras partes del cuerpo.

Como se usa en el presente documento, el término "carcinomas" se refiere a cánceres de células epiteliales, que

son células que cubren la superficie del cuerpo, producen hormonas y forman glándulas. Son ejemplos de carcinomas cánceres de piel, pulmón, colon, estómago, mama, próstata y glándula tiroideas.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de ácido nucleico aislada" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que normalmente está asociada en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada está en una forma o configuración distinta de en la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en
10 células que expresan normalmente el anticuerpo donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosómica diferente de la de las células naturales.

La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN implicadas en la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador en particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas usan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.
15

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se sitúa en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder de secreción está unido operativamente con ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente con una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente con una secuencia codificante si se coloca de manera que facilite la traducción. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder de secreción, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores sean contiguos. La unión se realiza mediante ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si no existen dichos sitios, se usan adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica habitual.
20

Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular", y "cultivo celular" se pueden usar indistintamente y todas estas denominaciones incluyen la descendencia. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y cultivos procedentes de la misma sin tener en cuenta el número de transferencias. Se entiende también que toda la descendencia puede no ser exactamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluyen descendientes mutantes que tienen la misma función o actividad biológica que la usada para cribar la célula transformada originalmente. Cuando se pretendan denominaciones distintas, esto resultará evidente según el contexto.
25
30
35

Como se usa en el presente documento, "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" se refiere a un procedimiento o una técnica en la que pequeñas cantidades de un trozo específico de ácido nucleico, ARN y/o ADN, se amplifican como se describe en, p. ej., la patente de los Estados Unidos n.º 4.683.195. En general, debe encontrarse disponible información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá, de manera que puedan diseñarse cebadores oligonucleotídicos; estos cebadores tendrán una secuencia idéntica o similar a las cadenas opuestas del molde para amplificar. Los nucleótidos 5' terminales de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR se puede usar para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN específicas a partir de ADN genómico total y ADNc transcrito a partir de ARN celular total, secuencias de bacteriófago o plásmido, etc. Véase, en general, Mullis *et al.* (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263; Erlich, ed., (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.) Como se usa en el presente documento, la PCR se considera uno, pero no el único, ejemplo de un método de reacción de la polimerasa de ácido nucleico para amplificar una muestra de prueba de ácido nucleico que comprende el uso de un ácido nucleico conocido como cebador y una polimerasa de ácido nucleico para amplificar o generar un trozo específico de ácido nucleico.
40
45
50

Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia de línea germinal" se refiere a una secuencia de secuencias de ADN de inmunoglobulina no reordenadas, incluyendo secuencias de línea germinal de roedor (p. ej., ratón) y humanas. Se puede usar cualquier fuente adecuada de ADN de inmunoglobulina no reordenado. Se pueden obtener secuencias de la línea germinal humana, por ejemplo, de las bases de datos de la línea germinal JOINSOLVER® en el sitio web del Instituto Nacional de Artritis y Enfermedades Musculoesqueléticas y de la Piel de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos. Se pueden obtener secuencias de la línea germinal de ratón, por ejemplo, como se describe en Giudicelli *et al.* (2005) Nucleic Acids Res. 33: D256-D261.
55
60

Para examinar el grado de mejora de la actividad de GTR, por ejemplo, se tratan muestras o ensayos que comprenden, p. ej., una proteína, un gen, una célula o un organismo dado con un posible agente activador o inhibidor y se comparan con muestras de control sin el agente. A las muestras de control, es decir, no tratadas con agente, se les asigna un valor de actividad relativa del 100 %. Se logra inhibición cuando el valor de actividad en relación con el control es de aproximadamente 90 % o menos, normalmente 85 % o menos, más normalmente 80 % o menos, más normalmente 75 % o menos, en general 70 % o menos, más en general 65 % o menos, más en
65

general 60 % o menos, normalmente 55 % o menos, habitualmente 50 % o menos, más habitualmente 45 % o menos, más habitualmente 40 % o menos, preferentemente 35 % o menos, más preferentemente 30 % o menos, aún más preferentemente 25 % o menos y lo más preferentemente menos de 20 %. Se logra activación cuando el valor de la actividad en relación con el control es de aproximadamente 110 %, en general al menos 120 %, más en general al menos 140 %, más en general al menos 160 %, con frecuencia al menos 180 %, con más frecuencia al menos 2 veces, con más frecuencia al menos 2,5 veces, habitualmente al menos 5 veces, más habitualmente al menos 10 veces, preferentemente al menos 20 veces, más preferentemente al menos 40 veces y lo más preferentemente más de 40 veces mayor.

Los criterios de valoración en la activación o inhibición se pueden supervisar de la siguiente manera. La activación, inhibición y respuesta al tratamiento, p. ej., de una célula, líquido fisiológico, tejido, órgano y sujeto animal o humano, se pueden supervisar mediante un criterio de valoración. El criterio de valoración puede comprender una cantidad o porcentaje predeterminado de, p. ej., un indicio de inflamación, oncogenicidad o desgranulación o secreción celular, tal como la liberación de una citocina, oxígeno tóxico o una proteasa. El criterio de valoración puede comprender, p. ej., una cantidad predeterminada de flujo o transporte de iones; migración celular; adhesión celular; proliferación celular; potencial de metástasis; diferenciación celular; y cambio de fenotipo, p. ej., cambio de expresión del gen relacionado con inflamación, apoptosis, transformación, ciclo celular o metástasis (véase, p. ej., Knight (2000) *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30: 145-158; Hood y Cheresch (2002) *Nature Rev. Cancer* 2: 91-100; Timme *et al.* (2003) *Curr. Drug Targets* 4: 251-261; Robbins e Itzkowitz (2002) *Med. Clin. North Am.* 86: 1467-1495; Grady y Markowitz (2002) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3: 101-128; Bauer, *et al.* (2001) *Glia* 36: 235-243; Stanimirovic y Satoh (2000) *Brain Pathol.* 10: 113-126).

Un criterio de valoración de inhibición es, en general, 75 % del control o menos, preferentemente 50 % del control o menos, más preferentemente 25 % del control o menos y lo más preferentemente 10 % del control o menos. En general, un criterio de valoración de activación es al menos 150 % del control, preferentemente al menos dos veces el control, más preferentemente al menos cuatro veces el control y lo más preferentemente al menos 10 veces el control.

"Molécula pequeña" se define como una molécula con un peso molecular que es menor de 10 kDa, normalmente menor de 2 kDa y preferentemente menor de 1 kDa. Las moléculas pequeñas incluyen, pero sin limitación, moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas, moléculas orgánicas que contienen un componente inorgánico, moléculas que comprenden un átomo radioactivo, moléculas sintéticas, peptidomiméticos y miméticos de anticuerpos. Como producto terapéutico, una molécula pequeña puede ser más permeable a las células, menos susceptible a la degradación y menos propensa a inducir una respuesta inmunitaria que las moléculas grandes. Se describen moléculas pequeñas, tales como peptidomiméticos de anticuerpos y citocinas, así como toxinas de moléculas pequeñas. Véase, p. ej., Casset *et al.* (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307: 198-205; Muyldermans (2001) *J. Biotechnol.* 74: 277-302; Li (2000) *Nat. Biotechnol.* 18: 1251-1256; Apostolopoulos *et al.* (2002) *Curr. Med. Chem.* 9: 411-420; Monfardini *et al.* (2002) *Curr. Pharm. Des.* 8: 2185-2199; Domingues *et al.* (1999) *Nat. Struct. Biol.* 6: 652-656; Sato y Sone (2003) *Biochem. J.* 371: 603-608; patente de los Estados Unidos n.º 6.326.482.

La unión "específica" o "selectiva", cuando se hace referencia a un ligando/receptor, anticuerpo/antígeno u otro par de unión, indica una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por tanto, en condiciones designadas, un ligando específico se une con un receptor en particular y no se une en una cantidad significativa con otras proteínas presentes en la muestra. Como se usa en el presente documento, se dice que un anticuerpo se une específicamente con un polipéptido *que comprende* una secuencia dada (en este caso G1TR) si se une con polipéptidos que comprenden la secuencia de G1TR pero no se une a proteínas que carecen de la secuencia de G1TR. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente con un polipéptido que comprende G1TR puede unirse con una forma de G1TR marcada con FLAG® pero no se unirá a otras proteínas marcadas con FLAG®.

El anticuerpo, o composición de unión procedente del sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, del método contemplado se une con su antígeno con una afinidad que es al menos dos veces mayor, preferentemente al menos diez veces mayor, más preferentemente al menos 20 veces mayor y lo más preferentemente al menos 100 veces mayor que la afinidad con antígenos no relacionados. En una realización preferida, el anticuerpo tendrá una afinidad que es mayor de aproximadamente 10⁹ litros/mol, según lo determinado, p. ej., por análisis de Scatchard. Munsen *et al.* (1980) *Analyt. Biochem.* 107: 220-239.

"Infección vírica crónica" o "infección vírica persistente", como se usa en el presente documento, significa una infección vírica de seres humanos u otros animales que puede infectar a un hospedador y reproducirse dentro de las células de un hospedador durante un periodo prolongado de tiempo, habitualmente semanas, meses o años, sin resultar letal. Entre los virus que dan lugar a infecciones crónicas y que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención están los virus del papiloma humano (VPH), virus del herpes simple y otros virus de herpes, los virus de la hepatitis B y C (VHB y VHC), así como otros virus de hepatitis, el virus del sarampión, todos los cuales pueden producir enfermedades clínicas importantes, y VIH. La infección prolongada puede conducir finalmente a la inducción de una enfermedad que puede ser, p. ej., en el caso del cáncer de hígado por virus de la hepatitis C, letal

para el paciente. Otras infecciones víricas crónicas que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen virus de Epstein Barr (VEB), así como otros virus tales como los que pueden estar asociados a tumores o, en el caso de animales, diversas enfermedades víricas veterinarias, por ejemplo, las de mascotas domésticas o animales de granja importantes en la agricultura.

5 La expresión "actividad antivírica" se refiere a una inhibición de la transmisión vírica a células no infectadas, inhibición de la replicación de un virus, prevención del establecimiento del virus en un hospedador o mejora o alivio de los síntomas de la enfermedad provocada por infección vírica. Estos efectos pueden demostrarse por una reducción de la carga vírica o disminución de la mortalidad y/o morbilidad, describiéndose dichos ensayos posteriormente. Un agente o fármaco antivírico tiene actividad antivírica y es útil para tratar infecciones víricas persistentes o crónicas solo o como parte de una terapia de combinación de múltiples fármacos.

II. General

15 La presente invención proporciona anticuerpos anti-GITR modificados por ingeniería genética y usos de los mismos para tratar trastornos inmunitarios, en particular, deterioro de la respuesta a enfermedades infecciosas (incluyendo infecciones víricas) y cáncer.

20 GITR, también conocido como TNFRSF18, es un receptor perteneciente a la superfamilia TNR-R. Hasta ahora, las estructuras cristalinas de GITR humano o de ratón no están disponibles, sin embargo, se puede establecer una arquitectura modular de la molécula, en función de estudios descritos, p. ej., en Naismith y Sprang (1998) Trends Biochem. Sci. 23: 74-79. La figura 2 ilustra que GITR humano se puede dividir en 6 módulos. A partir de los estudios a continuación, determinados anticuerpos que tienen actividad agonista pueden tener epítopos conformacionales que abarcan los módulos 3 y 4.

25 II. Generación de anticuerpos específicos de GITR

Se puede usar cualquier método adecuado para generar anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, un receptor se puede inmunizar con GITR o un fragmento del mismo. Se puede usar cualquier método adecuado de inmunización. Dichos métodos pueden incluir adyuvantes, otros inmunoestimulantes, inmunizaciones repetidas de refuerzo y el uso de una o más vías de inmunización. Se puede usar cualquier fuente adecuada de GITR como inmunógeno para la generación del anticuerpo no humano de las composiciones y métodos desvelados en el presente documento. Dichas formas incluyen, pero sin limitación, proteína completa, péptido o péptidos y epítopos generados mediante medios de degradación recombinantes, sintéticos, químicos o enzimáticos conocidos en la técnica. En realizaciones preferidas, el inmunógeno comprende la parte extracelular de GITR.

Se puede usar cualquier forma del antígeno para generar el anticuerpo que sea suficiente para generar un anticuerpo biológicamente activo. Por tanto, el antígeno inductor puede ser un solo epítipo, múltiples epítopos o la proteína completa sola o en combinación con uno o más agentes potenciadores de la inmunogenicidad conocidos en la técnica. El antígeno inductor puede ser una proteína aislada de longitud completa, una proteína de superficie celular (p. ej., inmunización con células transfectadas con al menos una parte del antígeno) o una proteína soluble (p. ej., inmunización solo con la parte del dominio extracelular de la proteína). El antígeno se puede producir en una célula modificada genéticamente. El ADN que codifica el antígeno puede ser genómico o no genómico (p. ej., ADNc) y codifica al menos una parte del dominio extracelular. Como se usa en el presente documento, el término "parte" se refiere al número mínimo de aminoácidos o ácidos nucleicos, según sea adecuado, para constituir un epítipo inmunogénico del antígeno de interés. Se puede emplear cualquier vector genético adecuado para la transformación de las células de interés, incluyendo, pero sin limitación, vectores adenovíricos, plásmidos y vectores no víricos, tales como lípidos catiónicos.

Se puede usar cualquier método adecuado para obtener un anticuerpo con las propiedades biológicas deseadas para potenciar la señalización de GITR. Es deseable preparar anticuerpos monoclonales (mAb) a partir de diversos hospedadores mamíferos, tales como ratones, ratas, otros roedores, seres humanos, otros primates, etc. Se puede encontrar la descripción de técnicas para preparar dichos anticuerpos monoclonales en, p. ej., Stites *et al.* (eds.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (4ª ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA y referencias citadas en el mismo; Harlow y Lane (1988) ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL CSH Press; Goding (1986) MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2ª ed.) Academic Press, Nueva York, NY. Por tanto, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales mediante diversas técnicas familiares para los investigadores expertos en la materia. Normalmente, las células de bazo de un animal inmunizado con un antígeno deseado se immortalizan, habitualmente mediante fusión con una célula de mieloma. Véase Kohler y Milstein (1976) Eur. J. Immunol. 6: 511-519. Los métodos alternativos de immortalización incluyen transformación con el virus de Epstein Barr, oncogenes o retrovirus, u otros métodos conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Doyle *et al.* (eds. 1994 y suplementos periódicos) CELL AND TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES, John Wiley and Sons, Nueva York, NY. Las colonias que surgen de células inmortalizadas individuales se exploran para determinar la producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad deseadas por el antígeno y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por dichas células puede potenciarse mediante diversas técnicas, incluyendo inyección en la cavidad peritoneal de un hospedador vertebrado. Como alternativa, se pueden aislar secuencias de ADN que codifican un anticuerpo

monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo mediante exploración de una biblioteca de ADN de linfocitos B humanos según, p. ej., el protocolo general esbozado por Huse *et al.* (1989) *Science* 246: 1275-1281.

5 Otras técnicas adecuadas implican la selección de bibliotecas de anticuerpos en fagos o vectores similares. Véase, p. ej., Huse *et al.* mencionado anteriormente; y Ward *et al.* (1989) *Nature* 341: 544-546. Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención se pueden usar con o sin modificación, incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados. Con frecuencia, los polipéptidos y anticuerpos se marcarán mediante la unión, covalente o no covalente, de una sustancia que proporciona una señal detectable. Se conoce una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación y se informa de ellos ampliamente en la literatura científica y de patentes. Los marcadores
10 adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las patentes que enseñan el uso de dichos marcadores incluyen las patentes de los Estados Unidos n.º 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241. Además, se pueden producir inmunoglobulinas recombinantes, véase Cabilly, patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567; y Queen *et al.* (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033; o hecho en ratones transgénicos, véase Méndez *et al.* (1997) *Nature Genetics* 15: 146-156. Véase además tecnologías Abgenix y Medarex.

Como alternativa, se pueden producir anticuerpos monoclonales mediante el enriquecimiento de poblaciones clonales de linfocitos B aislados de bazo de animales (p. ej., ratones, ratas, conejos, etc.) inmunizados con G1TR humano (véase, p. ej., documentos WO2008045140, US5627052 y US20030186327).
20

Se pueden inducir anticuerpos o composiciones de unión contra fragmentos predeterminados de G1TR mediante inmunización de animales con conjugados del polipéptido, fragmentos, péptidos o epítomos con proteínas transportadoras. Se preparan anticuerpos monoclonales a partir de células que secretan el anticuerpo deseado. Estos anticuerpos pueden explorarse para detectar la unión a G1TR normal o defectuoso. Estos anticuerpos monoclonales habitualmente se unen con al menos una K_d de aproximadamente 1 μ M, más habitualmente al menos aproximadamente 300 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 300 pM, 100 pM, 30 pM o mejor, habitualmente determinada mediante ELISA o Biacore. También se pueden identificar anticuerpos no humanos adecuados usando los ensayos biológicos descritos en los ejemplos 5 y 6, a continuación.
25

30 Los hibridomas correspondientes a los clones 36E5, 3D6, 61G6, 6H6 y 61F6 se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") según los requisitos del Tratado de Budapest, como PTA-9890, PTA-9889, PTA-9891, PTA-9892 y PTA-9893, respectivamente, el 25 de marzo de 2009.

35 Los hibridomas correspondientes a los clones 1D8, 17F10, 35D8, 49A1, 9E5 y 31H6 se depositaron en la ATCC de acuerdo con los requisitos del Tratado de Budapest el 21 de agosto de 2009, como PTA-10286, PTA-10287, PTA-10288, PTA-10289, PTA-10290 y PTA-10291.

40 IV. Humanización de anticuerpos específicos de G1TR

Se puede usar cualquier anticuerpo no humano adecuado como fuente para la región hipervariable. Las fuentes de anticuerpos no humanos incluyen, pero sin limitación, murino (p. ej. *Mus musculus*), rata (p. ej. *Rattus norvegicus*), lagomorfos (incluyendo conejos), bovinos y primates. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de región marco conservada (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Asimismo, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar
45 adicionalmente el rendimiento de anticuerpos de la actividad biológica deseada. Para más detalles, véase Jones *et al.* (1986) *Nature* 321: 522-525; Reichmann *et al.* (1988) *Nature* 332: 323-329; y Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596.

50 Se han descrito métodos para modificar por ingeniería recombinante los anticuerpos, p. ej., por Boss *et al.* (patente de los Estados Unidos n.º 4.816.397), Cabilly *et al.* (patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567), Ley *et al.* (publicación de solicitud de patente europea n.º 438310) y Winter (publicación de solicitud de patente europea n.º 239400).

60 Se preparan variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-G1TR humanizado mediante la introducción de cambios de nucleótidos adecuados en el ADN del anticuerpo anti-G1TR humanizado o mediante síntesis de péptidos. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, supresiones de, y/o inserciones en, y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos mostradas para el anticuerpo anti-G1TR humanizado. Puede efectuarse cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, a condición de que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden
65 alterar los procesos postraduccionales del anticuerpo anti-G1TR humanizado, tales como cambiar el número o la posición de los sitios de glucosilación.

Un método útil para la identificación de determinados restos o regiones del polipéptido de anticuerpo anti-GITR humanizado que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de exploración de alanina", como se describe en Cunningham y Wells (1989) *Science* 244: 1081-1085. Aquí, se identifican un resto o grupo de restos diana (p. ej., restos con carga tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o con carga negativa (lo más preferente alanina o polialanina) para alterar la interacción de los aminoácidos con el antígeno de GITR. Los restos de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después introduciendo variantes adicionales o diferentes en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí misma esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza mutagénesis de exploración de Ala o aleatoria en el codón o región diana y las variantes de anticuerpos de anti-GITR humanizadas expresadas se exploran para detectar la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían en su longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen anticuerpo anti-GITR humanizado con un resto metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado con un marcador epitópico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo anti-GITR humanizado incluyen la fusión con el extremo N o C de anticuerpo anti-GITR humanizado de una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo anti-GITR humanizado eliminado y un resto diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen los bucles hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR.

Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Por alteración se entiende la supresión de uno o más restos de carbohidrato hallados en el anticuerpo y/o la adición de uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glucosilación de anticuerpos normalmente está ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas de asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono con la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

Se realiza convenientemente adición de sitios de glucosilación al anticuerpo alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también se puede realizar mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

Otro tipo más de variante de aminoácidos es la sustitución de restos para proporcionar mayor estabilidad química del anticuerpo humanizado final. Por ejemplo, un resto de asparagina (N) puede cambiarse para reducir el potencial de formación de isoaspartato en cualquier secuencia de NG dentro de una CDR de roedor. Puede producirse un problema similar en una secuencia de DG. Reissner y Aswad (2003) *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 1281. La formación de isoaspartato puede debilitar o anular completamente la unión de un anticuerpo con su antígeno diana. Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116: 731 en 734. En una realización, la asparagina se cambia a glutamina (Q). Además, los restos de metionina en CDR de roedor pueden cambiarse para reducir la posibilidad de que el azufre de la metionina se oxide, lo que podría reducir la afinidad de unión al antígeno y también contribuir a la heterogeneidad molecular en la preparación final de anticuerpos. Misma referencia. En una realización, la metionina se cambia a alanina (A). Los anticuerpos con dichas sustituciones se exploran posteriormente para asegurar que las sustituciones no disminuyan la afinidad de unión a GITR hasta niveles inaceptables.

Se preparan moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo específico de GITR mediante diversos métodos conocidos en la materia. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida), mutagénesis por PCR y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo de anti-GITR humanizado.

Habitualmente, las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-GITR humanizado tendrán una secuencia de aminoácidos que tenga al menos 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos del anticuerpo humanizado original de la cadena pesada o ligera, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 % y lo más preferentemente al menos 95 %, 98 % o 99 %. La identidad u homología con respecto a esta secuencia se define en el presente

documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los restos de anti-GITR humanizado, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin tener en cuenta ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. No se interpretará que ninguna de las extensiones, supresiones o inserciones N-terminales, C-terminales o internas en la secuencia de anticuerpos afecte a la identidad u homología de secuencia.

El anticuerpo humanizado se puede seleccionar de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. Se puede usar cualquier isotipo de IgG, incluyendo IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. También se contemplan variantes de los isotipos de IgG. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo. La optimización de las secuencias de dominio constante necesarias para generar la actividad biológica deseada se logra fácilmente explorando los anticuerpos en los ensayos biológicos descritos en los ejemplos.

De manera análoga, se puede usar cualquier clase de cadena ligera en las composiciones y métodos del presente documento. Específicamente, kappa, lambda o variantes de las mismas son útiles en las presentes composiciones y métodos.

Se puede usar cualquier parte adecuada de las secuencias de CDR del anticuerpo no humano. Las secuencias de CDR se pueden mutar mediante sustitución, inserción o supresión de al menos un resto de modo que la secuencia de CDR sea distinta de la secuencia de anticuerpo humana y no humana empleada. Se contempla que dichas mutaciones serían mínimas. Normalmente, al menos 75 % de los restos de anticuerpos humanizados corresponderán a los de los restos de CDR no humanos, con más frecuencia 90 % y lo más preferentemente más del 95 %.

Se puede usar cualquier parte adecuada de las secuencias de FR del anticuerpo humano. Las secuencias de FR se pueden mutar mediante sustitución, inserción o supresión de al menos un resto de modo que la secuencia de FR sea distinta de la secuencia de anticuerpo humana y no humana empleada. Se contempla que dichas mutaciones serían mínimas. Normalmente, al menos 75 % de los restos de anticuerpos humanizados corresponderán a los de los restos de FR humanos, con más frecuencia 90 % y lo más preferentemente más de 95 %, 98 % o 99 %.

Los restos de CDR y FR se determinan según la definición de secuencia convencional de Kabat. Kabat *et al.* (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda Md. Las SEQ ID NO: 1-11 muestran las secuencias de dominio variable de cadena pesada de diversos anticuerpos de roedor anti-GITR humano descritos en el presente documento y las SEQ ID NO: 12-22 representan las secuencias de dominio variable de cadena ligera.

Tabla 2

Secuencias y dominios de cadena pesada					
CLON DE ANTICUERPO	SEQ ID NO:	RESTOS DE V _H	RESTOS DE CDR DE CADENA PESADA		
			CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
36H5	1	1-118	26-35	50-65	98-107
3D6	2	1-123	26-35	50-66	99-112
61G6	3	1-118	26-36	51-66	99-107
6H6	4	1-118	26-35	50-66	99-107
61F6	5	1-119	26-35	50-66	99-108
1D8	6	1-122	26-37	52-67	100-111
17F10	7	1-117	26-35	50-65	98-106
35D8	8	1-120	26-35	50-65	98-109
49A1	9	1-120	26-35	50-65	98-109
9E5	10	1-121	26-37	52-67	100-110
31H6	11	1-121	26-37	52-67	100-110

Tabla 3

Secuencias y dominios de cadena ligera					
CLON DE ANTICUERPO	SEQ ID NO:	RESTOS DE V _L	RESTOS DE CDR DE CADENA LIGERA		
			CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
36H5	12	1-113	24-39	54-60	93-101
3D6	13	1-113	24-39	55-61	94-102

(continuación)

Secuencias y dominios de cadena pesada					
CLON DE ANTICUERPO	SEQ ID NO:	RESTOS DE V _H	RESTOS DE CDR DE CADENA PESADA		
			CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
61G6	14	1-108	24-33	49-55	88-96
6H6	15	1-110	24-35	51-57	90-98
61F6	16	1-113	24-38	54-60	93-101
1D8	17	1-118	24-39	55-61	94-102
17F10	18	1-113	24-34	50-56	89-97
35D8	19	1-114	24-34	50-56	89-98
49A1	20	1-114	24-34	50-56	89-98
9E5	21	1-113	24-34	50-56	89-97
31H6	22	1-113	24-34	50-56	89-97

Las CDR descritas en el presente documento incluyen variantes de cualquier CDR de secuencia individual desvelada en el presente documento (SEQ ID NO: 23-88), en las que la variante comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de aminoácidos conservadoras con respecto a la secuencia desvelada, según lo determinado usando los datos de la tabla 1.

También se describen en el presente documento anticuerpos quiméricos. Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos quiméricos habituales comprenden una parte de la cadena pesada y/o ligera idéntica a, u homóloga de, secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de una especie en particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico a u homólogo de secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada. Véase patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855.

Los anticuerpos biespecíficos también son útiles en los presentes métodos y composiciones descritos en el presente documento. Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo, normalmente un anticuerpo monoclonal, que tiene especificidades de unión para al menos dos epítopos antigénicos diferentes. Los epítopos pueden ser del mismo antígeno. Los epítopos pueden ser de dos antígenos diferentes. Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos biespecíficos de manera recombinante usando la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina. Véase, p. ej., Milstein *et al.* (1983) Nature 305: 537-39. Como alternativa, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando unión química. Véase, p. ej., Brennan *et al.* (1985) Science 229: 81. Los anticuerpos biespecíficos incluyen fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Véase, p. ej., Holliger *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6444-48, Gruber *et al.* (1994) J. Immunol. 152: 5368.

En otras realizaciones más, se pueden agregar dominios constantes diferentes a regiones V_L y V_H humanizadas procedentes de las CDR proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, si un uso particular previsto de un anticuerpo (o fragmento) de la presente invención requiriera alteración de las funciones efectoras, se puede usar un dominio constante de cadena pesada distinto de IgG1. Aunque los anticuerpos IgG1 proporcionan una semivida larga y funciones efectoras, tales como activación del complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, dichas actividades pueden no ser deseables para todos los usos del anticuerpo. En dichos casos, se puede usar un dominio constante de IgG4 o IgG2, por ejemplo.

Las formas precursoras y modificadas por ingeniería genética de los anticuerpos de la presente invención también se pueden conjugar con un resto químico. El resto químico puede ser, entre otros, un polímero, un radionúclido o un factor citotóxico. Preferentemente, el resto químico es un polímero que aumenta la semivida de la molécula de anticuerpo en el cuerpo de un sujeto. Los polímeros adecuados incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG) (p. ej. PEG con un peso molecular de 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 12 kDa, 20 kDa, 30 kDa o 40 kDa), dextrano y monometoxipolietilenglicol (mPEG). Lee *et al.*, (1999) (Bioconj. Chem. 10: 973-981) desvela anticuerpos monocatenarios conjugados con PEG. Wen *et al.*, (2001) (Bioconj. Chem. 12: 545-553) desvelan anticuerpos de conjugación con PEG que está unido con un quelante radiometálico (ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA)).

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos o las proteínas solubles de G1TR o fragmentos de las mismas de la invención también pueden conjugarse con marcadores tales como ⁹⁹Tc, ⁹⁰Y, ¹¹¹In, ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, ¹³¹I, ¹¹C, ¹⁵O, ¹³N, ¹⁸F, ³⁵S, ⁵¹Cr, ⁵⁷To, ²²⁶Ra, ⁶⁰Co, ⁵⁹Fe, ⁵⁷Se, ¹⁵²Eu, ⁶⁷Cu, ²¹⁷Ci, ²¹¹At, ²¹²Pb, ⁴⁷Sc, ¹⁰⁹Pd, ²³⁴Th y ⁴⁰K, ¹⁵⁷Gd, ⁵⁵Mn, ⁵²Tr y ⁵⁶Fe.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos o las proteínas solubles de G1TR o fragmentos de las mismas de la

invención también pueden conjugarse con marcadores fluorescentes y quimioluminiscentes, incluyendo fluoróforos tales como quelatos de tierras raras, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, isotiocianato, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftalaldehído, fluorescamina, ¹⁵²Eu, dansilo, umbeliferona, luciferina, marcador luminal, marcador isoluminal, un marcador de éster de acridinio aromático, un marcador de imidazol, un
5 marcador de sal de acridinio, un marcador de éster de oxalato, un marcador de aecuorina, 2,3-dihidroftalacinadionas, biotina/avidina, marcadores de espín y radicales libres estables.

Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para conjugar las moléculas de anticuerpo o moléculas de proteína de la invención con los diversos restos, incluyendo los métodos descritos en Hunter *et al.*, (1962) Nature
10 144: 945; David *et al.*, (1974) Biochemistry 13: 1014; Pain *et al.*, (1981) J. Immunol. Meth. 40: 219; y Nygren, J., (1982) Histochem. and Cytochem. 30: 407. Los métodos para conjugar anticuerpos y proteínas son convencionales y muy bien conocidos en la técnica.

V. Actividad biológica de anticuerpos anti-GITR humanizados

Los anticuerpos que tienen las características identificadas en el presente documento como deseables en un anticuerpo anti-GITR humanizado pueden explorarse para determinar la actividad biológica inhibidora *in vitro* o
15 afinidad de unión adecuada. Los anticuerpos agonistas se pueden distinguir de los anticuerpos antagonistas usando el ensayo biológico proporcionado en el ejemplo 5. Los anticuerpos que presentan actividad agonista no bloquearán la actividad de GITR, sino que, en cambio, estimularán la respuesta normalmente mediada por señalización de GITR.

Para detectar anticuerpos que se unan con el epítipo en GITR humano con el que se une un anticuerpo de interés (p. ej., los que bloquean la unión de GITR), se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el
25 descrito en ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Es probable que los anticuerpos que se unen con el mismo epítipo se bloqueen de manera cruzada en dichos ensayos, pero no todos los anticuerpos de bloqueo cruzado necesariamente se unirán exactamente en el mismo epítipo, ya que se puede producir bloqueo cruzado a partir del impedimento estérico de la unión de anticuerpos por anticuerpos que se unen en epítipos solapantes o incluso epítipos no solapantes cercanos.

Como alternativa, se puede realizar mapeo de epítipos, p. ej., como se describe en Champe *et al.* (1995) J. Biol. Chem. 270: 1388-1394, para determinar si el anticuerpo se une con un epítipo de interés. También se puede usar
30 "mutagénesis de exploración de alanina", como se describe en Cunningham y Wells (1989) Science 244: 1081-1085, o alguna otra forma de mutagénesis puntual de restos de aminoácidos en GITR humano para determinar el epítipo funcional para un anticuerpo anti-GITR de la presente invención. Los estudios de mutagénesis, sin embargo, también pueden revelar restos de aminoácidos que son cruciales para la estructura tridimensional general de GITR pero que no están implicados directamente en los contactos de anticuerpo-antígeno y, por tanto, pueden ser necesarios otros métodos para confirmar un epítipo funcional determinado usando este método.

El epítipo con el que se une un anticuerpo específico también puede determinarse evaluando la unión del anticuerpo con péptidos que comprenden fragmentos de GITR humano (SEQ ID NO: 41). Se puede sintetizar una serie de péptidos solapantes que abarcan la secuencia de GITR y se puede seleccionar para unión, p. ej., en un
40 ELISA directo, un ELISA competitivo (donde se evalúa la capacidad del péptido para evitar la unión de un anticuerpo a GITR unido a un pocillo de una placa de microtitulación) o en un chip. Dichos métodos de exploración de péptidos pueden no tener capacidad para detectar algunos epítipos funcionales discontinuos, es decir, epítipos funcionales que implican restos de aminoácidos que no son contiguos a lo largo de la secuencia primaria de la cadena polipeptídica de GITR.

El epítipo con el que se unen anticuerpos de la presente invención también puede determinarse mediante métodos estructurales, tales como determinación de la estructura cristalina por rayos X (p. ej., documento WO2005/044853),
50 modelado molecular y espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN), incluyendo determinación por RMN de las tasas de intercambio de H-D de hidrógenos de amida lábiles en GITR cuando están libres y cuando se unen en un complejo con un anticuerpo de interés (Zinn-Justin *et al.* (1992) Biochemistry 31: 11335-11347; Zinn-Justin *et al.* (1993) Biochemistry 32: 6884-6891).

Con respecto a la cristalografía de rayos X, se puede realizar cristalización usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica (p. ej., Giege *et al.* (1994) Acta Crystallogr. D50: 339-350; McPherson (1990) Eur. J. Biochem. 189: 1-23),
60 incluyendo microlote (p. ej., Chayen (1997) Structure 5: 1269-1274), difusión de vapor de gota colgante (p. ej., McPherson (1976) J. Biol. Chem. 251: 6300-6303), siembra y diálisis. Es deseable usar una preparación de proteínas que tenga una concentración de al menos aproximadamente 1 mg/ml y preferentemente de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. La cristalización puede lograrse mejor en una solución precipitante que contiene polietilenglicol 1000-20.000 (PEG; peso molecular promedio que varía de aproximadamente 1000 a aproximadamente 20.000 Da), preferentemente de aproximadamente 5000 a aproximadamente 7000 Da, más preferentemente aproximadamente 6000 Da, variando las concentraciones de aproximadamente 10 % a aproximadamente 30 % (p/v). También puede ser deseable incluir un agente estabilizador
65 de proteínas, p. ej., glicerol a una concentración que varía de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 20 %.

Una sal adecuada, tal como cloruro de sodio, cloruro de litio o citrato de sodio también puede ser deseable en la solución de precipitación, preferentemente en una concentración que varía de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1000 mM. El precipitante se tampona preferentemente a un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 5,0, preferentemente de aproximadamente 4,0. Los tampones específicos útiles en la solución de precipitación pueden variar y son bien conocidos en la técnica. Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, tercera ed., (1994) Springer-Verlag, Nueva York. Los ejemplos de tampones útiles incluyen, pero sin limitación, HEPES, Tris, MES y acetato. Los cristales pueden crecer a una amplia gama de temperaturas, incluyendo 2 °C, 4 °C, 8 °C y 26 °C.

10 Anticuerpo: los cristales de antígeno se pueden estudiar usando técnicas de difracción de rayos X bien conocidas y pueden refinarse usando software informático tal como X-PLOR (Universidad de Yale, 1992, distribuido por Molecular Simulations, Inc.; véase, p. ej., Blundell y Johnson (1985) *Meth. Enzymol.* 114 y 115, H. W. Wyckoff *et al.* eds., Academic Press; publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2004/0014194) y BUSTER (Bricogne (1993) *Acta Cryst.* D49: 37-60; Bricogne (1997) *Meth. Enzymol.* 276A: 361-423, Carter y Sweet, eds.; Roversi *et al.* (2000) *Acta Cryst.* D56: 1313-1323).

20 Como se describe en el presente documento, se pueden obtener anticuerpos adicionales que se unen con el mismo epítipo que un anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, mediante exploración de anticuerpos inducidos contra GITR para unión con el epítipo o mediante inmunización de un animal con un péptido que comprende un fragmento de GITR humano que comprende la secuencia epitópica. Se podría esperar que los anticuerpos que se unen con mismo epítipo funcional presenten actividades biológicas similares, tales como bloqueo de la unión del receptor, y dichas actividades pueden confirmarse mediante ensayos funcionales de los anticuerpos.

25 Las afinidades de anticuerpos se pueden determinar usando análisis convencional. Son anticuerpos humanizados preferidos los que se unen a GITR humano con un valor de K_d de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M; preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{-8} M; más preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{-9} M; y lo más preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{-10} M o incluso 1×10^{-11} M.

30 Los anticuerpos y fragmentos de los mismos útiles en las presentes composiciones y métodos son anticuerpos y fragmentos biológicamente activos. Como se usa en el presente documento, la expresión "biológicamente activo" se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse al epítipo antigénico deseado y ejercer directa o indirectamente un efecto biológico. Como se usa en el presente documento, el término "específico" se refiere a la unión selectiva del anticuerpo con el epítipo del antígeno diana. Los anticuerpos se pueden analizar para determinar la especificidad de unión comparando la unión a GITR con la unión con antígeno o mezcla de antígenos irrelevante en un conjunto dado de condiciones. Si el anticuerpo se une a GITR al menos 10 y preferentemente 50 veces más que con antígeno o mezcla de antígenos irrelevante, entonces se considera que es específico. Un anticuerpo que "se une específicamente" a GITR no se une con proteínas que no comprenden las secuencias procedentes de GITR, es decir, "especificidad" como se usa en el presente documento se refiere a la especificidad por GITR y no ninguna otra secuencia que pueda estar presente en la proteína en cuestión. Por ejemplo, como se usa en el presente documento, un anticuerpo que "se une específicamente" con un polipéptido que comprende GITR normalmente se unirá con FLAG®-GITR, que es una proteína de fusión que comprende GITR y un marcador peptídico marcado con FLAG®, pero no se une con el marcador peptídico marcado con FLAG® solo o cuando se fusiona con una proteína distinta de GITR.

45 Los compuestos de unión específicos de GITR de la presente invención, tales como anticuerpos agonistas específicos de GITR, pueden mejorar su actividad biológica de cualquier manera, incluyendo, pero sin limitación, aumentando la respuesta inmunitaria a una infección microbiana.

50 VI. Composiciones farmacéuticas

Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles que incluyen el anticuerpo de GITR, el análogo de citocina o muteína, anticuerpo para el mismo o ácido nucleico del mismo, se mezcla con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Véase, p. ej., Remington's *Pharmaceutical Sciences* y *Farmacopea* de los Estados Unidos: Formulario nacional, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984).

55 Se pueden preparar formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico mezclando con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables en forma de, p. ej., polvos liofilizados, pastas, soluciones o suspensiones acuosas. Véase, p. ej., Hardman *et al.* (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, Nueva York, NY; Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams y Wilkins, Nueva York, NY; Avis *et al.* (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY; Lieberman *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY.

65 La toxicidad y eficacia terapéutica de las composiciones de anticuerpos, administradas solas o en combinación con un agente inmunosupresor, se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos

celulares o animales experimentales, p. ej., para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación de DL₅₀ con respecto a DE₅₀. Se prefieren anticuerpos que presenten índices terapéuticos altos. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la CE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración.

El modo de administración no es particularmente importante. Las vías adecuadas de administración pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosa o intestinal; suministro parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares. La administración del anticuerpo usado en la composición farmacéutica o para practicar el método de la presente invención se puede llevar a cabo de diversas formas convencionales, tales como ingestión oral, inhalación, aplicación tópica o inyección cutánea, subcutánea, intraperitoneal, parenteral, intraarterial o intravenosa.

Como alternativa, se puede administrar el anticuerpo de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección del anticuerpo directamente en una articulación artrítica o una lesión inducida por patógeno caracterizada por inmunopatología, con frecuencia en una formulación en depósito o de liberación sostenida. Asimismo, se puede administrar el anticuerpo en un sistema de administración de fármaco dirigido, por ejemplo, en un liposoma recubierto con un anticuerpo específico de tejido, que se dirige, por ejemplo, a la articulación artrítica o la lesión inducida por patógeno caracterizada por inmunopatología. Los liposomas se dirigirán a y serán captados de manera selectiva por el tejido aquejado.

La selección de un régimen de administración para un producto terapéutico depende de varios factores, incluyendo la tasa de recambio sérico o tisular de la entidad, el nivel de los síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células diana en la matriz biológica. Preferentemente, un régimen de administración maximiza la cantidad de producto terapéutico administrado al paciente compatible con un nivel aceptable de efectos secundarios. En consecuencia, la cantidad de producto biológico administrado depende en parte de la entidad en particular y la gravedad de la afección que se trate. Está disponible orientación en la selección de dosis adecuadas de anticuerpos, citocinas y moléculas pequeñas. Véase, p. ej., Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, Reino Unido; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Baert *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 348: 601-608; Milgrom *et al.* (1999) *New Engl. J. Med.* 341: 1966-1973; Slamon *et al.* (2001) *New Engl. J. Med.* 344: 783-792; Beniaminovitz *et al.* (2000) *New Engl. J. Med.* 342: 613-619; Ghosh *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 348: 24-32; Lipsky *et al.* (2000) *New Engl. J. Med.* 343: 1594-1602.

El médico realiza la determinación de la dosis adecuada, p. ej., usando parámetros o factores que se sabe o se sospecha en la técnica que afectan al tratamiento o que se predice que afectan al tratamiento. En general, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y a continuación se incrementa en pequeños incrementos hasta que se logra el efecto deseado u óptimo en relación con cualquier efecto secundario negativo. Las medidas de diagnóstico importantes incluyen las de síntomas de, p. ej., la inflamación o el nivel de citocinas inflamatorias producidas. Preferentemente, un producto biológico que se usará procede sustancialmente de la misma especie que el animal diana del tratamiento (p. ej., un anticuerpo humanizado para el tratamiento de sujetos humanos), minimizando de este modo cualquier respuesta inmunitaria al reactivo.

Se pueden proporcionar anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y citocinas mediante infusión continua o mediante dosis a intervalos de, p. ej., un día, 1-7 veces a la semana, una semana, dos semanas, mensualmente, bimensualmente, etc. Las dosis pueden proporcionarse por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía tópica, por vía oral, por vía nasal, por vía rectal, por vía intramuscular, por vía intracerebral, por vía intraespinal o por inhalación. Un protocolo de dosis preferido es uno que implica la dosis máxima o frecuencia de dosis que evita efectos secundarios indeseables significativos. Una dosis semanal total es, en general, de al menos 0,05 µg/kg, 0,2 µg/kg, 0,5 µg/kg, 1 µg/kg, 10 µg/kg, 100 µg/kg, 0,2 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg de peso corporal o más. Véase, p. ej., Yang *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 349: 427-434; Herold *et al.* (2002) *New Engl. J. Med.* 346: 1692-1698; Liu *et al.* (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67: 451-456; Portielji *et al.* (2000) *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 133-144. La dosis deseada de una molécula pequeña terapéutica, p. ej., un peptidomimético, producto natural o producto químico orgánico, es aproximadamente igual que para un anticuerpo o polipéptido, en moles/kg.

Como se usa en el presente documento, "inhibir" o "tratar" o "tratamiento" incluye un aplazamiento del desarrollo de los síntomas asociados a enfermedad autoinmunitaria o inmunopatología inducida por patógeno y/o una reducción de la gravedad de dichos síntomas que se desarrollarán o se espera que se desarrollen. Los términos incluyen además aliviar los síntomas descontrolados o no deseados de inmunopatología relacionada con autoinmunidad o inducida por patógeno existentes, prevenir síntomas adicionales y aliviar o prevenir las causas subyacentes de

dichos síntomas. Por tanto, los términos indican que se ha conferido un resultado beneficioso a un sujeto vertebrado con una enfermedad o síntoma de inmunopatología autoinmunitaria o inducida por patógenos o con el potencial de desarrollar dicha enfermedad o síntoma.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto de unión específico de GITR, p. ej., un anticuerpo, que, cuando se administra solo o en combinación con un agente terapéutico adicional a una célula, un tejido o un sujeto, es eficaz para prevenir o aliviar la enfermedad autoinmunitaria o la enfermedad o afección asociada a inmunopatología inducida por patógeno o la progresión de la enfermedad. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere además a la
10 cantidad del compuesto suficiente para aliviar síntomas, p. ej., tratamiento, curación, prevención o alivio de la afección médica relevante, o aumentar la tasa de tratamiento, curación, prevención o alivio de dichas afecciones. Cuando se aplica a un principio activo individual administrado solo, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a cantidades combinadas de los principios activos que dan como resultado el efecto terapéutico, ya se administran en combinación,
15 en serie o de manera simultánea. Una cantidad eficaz de producto terapéutico disminuirá los síntomas normalmente en al menos 10 %; habitualmente en al menos 20 %; preferentemente al menos aproximadamente 30 %; más preferentemente al menos 40 % y lo más preferentemente al menos 50 %.

Se conocen bien en la técnica métodos de administración conjunta o tratamiento con un segundo agente terapéutico. p. ej., una citocina, anticuerpo, esteroide, agente quimioterapéutico, antibiótico, antivírico o radiación, véase, p. ej., Hardman *et al.* (eds.) (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10^a ed., McGraw-Hill, Nueva York, NY; Poole y Peterson (eds.) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner y Longo (eds.) (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA.

25 Los agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos, adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB 1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno, tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediina (p. ej., calicheamicina, especialmente calicheamicina gammall y calicheamicina omega11 (véase, p. ej., Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del 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, doxilfluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestanol, testolactona; antiadrenales, tales como aminoglucetimidina, mitotano, trilostano; reabastecedor del ácido fólico, tales como ácido folínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), formulación de nanopartículas de paclitaxel obtenidas mediante ingeniería con albúmina, sin Cremophor, ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.) y doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina GEMZAR®; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina NAVELBINE®; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina XELODA®; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de

cualquiera de los anteriores.

También se incluyen agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (MSRE), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON; inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglucetimidina, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de nucleósido de citosina 1,3-dioxolano; oligonucleótidos antisentido, en particular, los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en proliferación celular anómala, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (p. ej., ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas tales como vacunas para terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rnrH ABARELIX®; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

En particular, el factor de crecimiento transformante (TGF)- β presenta una serie de efectos pleiotrópicos en las funciones celulares tales como proliferación, homeostasis, angiogénesis y cicatrización. La regulación aberrante de la función de TGF- β contribuye a la progresión del cáncer. La mayoría de los cánceres se caracterizan por la producción excesiva del factor de crecimiento transformante β por parte de los tumores, lo que puede promover el crecimiento tumoral y mediar en la transición de epitelial a mesenquimatoso. TGF- β también desempeña un papel fundamental dentro del sistema inmunitario manteniendo la tolerancia a través de la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia de linfocitos. Se ha mostrado que TGF- β es un elemento supresor importante para mejorar la función de Treg y amortiguar la inmunidad tumoral. Se contempla la administración de inhibidores de TGF- β junto con agonistas de GTR, p. ej., anticuerpos.

También se contempla la administración conjunta con terapias antiviricas. Los antiviricos incluyen cualquier fármaco que destruya virus. Los antiviricos pueden incluir interferones que actúan para inhibir la replicación del virus, inhibidores de proteasa e inhibidores de la transcriptasa inversa o agentes contenidos en la combinación de terapia antirretrovirica de gran actividad (TARGA) para el VIH.

Los sujetos veterinarios, experimentales o de investigación habituales incluyen monos, perros, gatos, ratas, ratones, conejos, cobayas, caballos y seres humanos.

VII. Producción de anticuerpos

En una realización, para la producción recombinante de los anticuerpos de la presente invención, los ácidos nucleicos que codifican las dos cadenas se aíslan y se insertan en uno o más vectores replicables para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (p. ej., usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector incluyen en general, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. En una realización, las cadenas tanto ligeras como pesadas de un anticuerpo anti-GTR humanizado de la presente invención se expresan a partir del mismo vector, p. ej., un plásmido o un vector adenovirico.

Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse por cualquier método conocido en la técnica. Los anticuerpos pueden expresarse en células de mamífero o de insecto en cultivo, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano (HEK) 293, células NSO de mieloma de ratón, células de riñón de cría de hámster (BHK), células ováricas de *Spodoptera frugiperda* (Sf9). Los anticuerpos secretados por células CHO pueden recuperarse y purificarse mediante métodos cromatográficos convencionales, tales como proteína A, intercambio catiónico, intercambio aniónico, interacción hidrófoba y cromatografía de hidroxipatita. Los anticuerpos resultantes se concentran y almacenan en acetato de sodio 20 mM, pH 5,5.

Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse en levadura según los métodos descritos en el documento WO2005/040395. En resumen, se introducen vectores que codifican las cadenas ligeras o pesadas individuales de un anticuerpo de interés en diferentes células haploides de levadura, p. ej., diferentes tipos de apareamiento de la levadura *Pichia pastoris*, siendo dichas células haploides de levadura opcionalmente auxótrofos complementarios. Las células de levadura haploides transformadas se pueden aparear o fusionar después para proporcionar una célula de levadura diploide capaz de producir las cadenas tanto pesada como ligera. La cepa diploide puede después secretar el anticuerpo completamente ensamblado y biológicamente activo. Los niveles de expresión relativos de las dos cadenas se pueden optimizar, por ejemplo, usando vectores con diferente número de copias, usando promotores transcripcionales de diferentes potencias o induciendo la expresión de promotores inducibles que conducen la transcripción de los genes que codifican una o ambas cadenas.

Como se describe en el presente documento, las respectivas cadenas pesadas y ligeras de una pluralidad de diferentes anticuerpos anti-GITR (los anticuerpos "originales") se introducen en células haploides de levadura para crear una biblioteca de cepas de levadura haploide de un tipo de apareamiento que expresa una pluralidad de cadenas ligeras y una biblioteca de cepas de levadura haploide de un tipo de apareamiento diferente que expresa una pluralidad de cadenas pesadas. Estas bibliotecas de cepas haploides se pueden aparear (o fusionar como esferoplastos) para producir una serie de células de levadura diploides que expresan una biblioteca combinatoria de anticuerpos comprendidos por las diversas permutaciones posibles de cadenas ligeras y pesadas. La biblioteca combinatoria de anticuerpos puede explorarse después para determinar si cualquiera de los anticuerpos tiene propiedades que son superiores (p. ej., mayor afinidad por GITR) a las de los anticuerpos originales. Véase, p. ej., documento WO2005/040395.

Como se describe en el presente documento, los anticuerpos de la presente descripción son anticuerpos de dominio humano en los que partes de un dominio variable de anticuerpo están unidos en un polipéptido de peso molecular de aproximadamente 13 kDa. Véase, p. ej., publicación de patente de los Estados Unidos n.º 2004/0110941. Dichos agentes de bajo peso molecular, de dominio único, proporcionan numerosas ventajas con respecto a facilidad de síntesis, estabilidad y vía de administración.

VIII. Usos

La presente invención proporciona anticuerpos anti-GITR y fragmentos de los mismos para su uso en el tratamiento y diagnóstico de trastornos y afecciones proliferativas o inflamatorias.

La presente invención proporciona anticuerpos anti-GITR y fragmentos de los mismos para su uso en métodos para diagnosticar la presencia de una infección microbiana o cáncer analizando los niveles de expresión de GITR en células, tejidos o líquidos corporales de prueba en comparación con los niveles de GITR en células, tejidos o líquidos corporales preferentemente del mismo tipo de un control. Como se demuestra en el presente documento, un aumento en el nivel de expresión de GITR, por ejemplo, en el paciente frente al control se asocia con la presencia de cáncer.

Normalmente, para un ensayo de diagnóstico cuantitativo, un resultado positivo que indica que el paciente analizado tiene cáncer o una enfermedad infecciosa, es uno en el que las células, los tejidos o los líquidos corporales tienen un nivel de expresión de GITR al menos dos veces mayor, cinco veces mayor, diez veces mayor, quince veces mayor, veinte veces mayor, veinticinco veces mayor.

Las técnicas de ensayo que pueden usarse para determinar los niveles de expresión de genes y proteínas, tales como GITR, de la presente invención, en una muestra procedente de un hospedador son bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos métodos de ensayo incluyen radioinmunoensayos, ensayos de PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR), ensayos cuantitativos de PCR en tiempo real, ensayos de inmunohistoquímica, ensayos de hibridación *in situ*, ensayos de unión competitiva, ensayos de transferencia de Western, ensayos de ELISA y ensayos de citometría de flujo, por ejemplo, análisis de FACS de dos colores para fenotipado de M2 frente a M1 de macrófagos asociados a tumores (Mantovani *et al.*, (2002) TRENDS in Immunology 23: 549-555).

Un ensayo de ELISA comprende inicialmente preparar un anticuerpo de la presente invención, específico para GITR, concretamente, 36E5 y anticuerpos de la presente divulgación, específicos para GITR, preferentemente 3D6, 61G6, 6H6, 61F6, 1D8, 17F10, 35D8, 49A1, 9E5 y 31H6 (colectivamente "anticuerpos de GITR"). Además, en general, se prepara un anticuerpo indicador que se une específicamente a GITR. El anticuerpo indicador está unido con un reactivo detectable tal como reactivo radiactivo, fluorescente o enzimático, por ejemplo, enzima peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina.

Para llevar a cabo el ELISA, al menos uno de los anticuerpos de GITR descritos anteriormente se incuba en un soporte sólido, p. ej., una placa de poliestireno que se une con el anticuerpo. Cualquier sitio libre de unión a proteína en la placa se cubre después incubando con una proteína inespecífica, tal como albúmina de suero bovino. A continuación, la muestra para analizar se incuba en la placa, uniéndose GITR durante ese tiempo con el anticuerpo de GITR específico unido a la placa de poliestireno. La muestra no unida se retira por lavado con tampón. Se coloca un anticuerpo indicador dirigido específicamente a GITR y unido con peroxidasa de rábano picante en la placa, lo que da como resultado la unión del anticuerpo indicador con cualquier anticuerpo monoclonal unido a GITR. Después se lava el anticuerpo indicador no unido. Después se añaden a la placa reactivos para actividad peroxidasa, incluyendo un sustrato calorimétrico. La peroxidasa inmovilizada, ligada a anticuerpos de GITR, produce un producto de reacción coloreado. La cantidad de color revelada en un periodo de tiempo dado es proporcional a la cantidad de proteína GITR presente en la muestra. Los resultados cuantitativos normalmente se obtienen por referencia a una curva patrón.

Se puede emplear un ensayo de competición en donde se unen anticuerpos específicos para GITR a un soporte sólido y se pasan GITR marcado y una muestra procedente del hospedador sobre el soporte sólido y la cantidad de marcador detectado unido al soporte sólido se puede correlacionar con una cantidad de GITR en la muestra.

Las pruebas anteriores pueden llevarse a cabo en muestras procedentes de diversas células, líquidos corporales y/o extractos tisulares, tales como homogeneizados o tejido solubilizado obtenidos de un paciente. Se obtienen extractos tisulares de manera rutinaria a partir de biopsia tisular y material de autopsia. Los líquidos corporales útiles en la presente invención incluyen sangre, orina, saliva o cualquier otra secreción corporal o derivado de la misma.
 5 Se entiende que el término "sangre" incluye sangre completa, plasma, suero o cualquier derivado de la sangre.

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para tratar infecciones víricas. La infección por VIH se caracteriza por defectos en la generación y el mantenimiento de células de memoria central. Las células de memoria central CD8+ tienen una semivida más corta y son menos abundantes en individuos infectados por VIH que en los
 10 controles. Además, la frecuencia de linfocitos T específicos de VIH tanto CD4+ como CD8+ disminuye rápidamente después del inicio de la terapia antirretrovírica de gran actividad (TARGA). La coestimulación en CD4+ por anti-GITR puede proporcionar un mecanismo para aumentar la respuesta de CD8+ de memoria y contribuir a la eliminación del virus. Se ha mostrado que el tratamiento de ratones infectados por virus de Friend de manera persistente con anticuerpo anti-GITR para aliviar la supresión por Treg mejoró significativamente la producción de IFN- γ por los
 15 linfocitos T CD8+ y permitió una reducción significativa de las cargas víricas (Dittmer *et al.*, (2004) *Immunity* 20: 293-303).

Otra característica de la infección por VIH es la apoptosis masiva de linfocitos T CD4+ que comienzan temprano en la infección por VIH. La supresión apoptótica progresiva de linfocitos T CD4 contribuye a debilitar las respuestas
 20 inmunitarias celulares específicas del VIH y al desarrollo del SIDA. Se ha mostrado que la coestimulación con GITR mejora la secreción de citocinas específicas de antígeno murino al proteger los linfocitos T de la apoptosis. Lahey *et al.* (2007) *J Infect Dis.* 196: 43-49) demostraron que el tratamiento anti-GITR de linfocitos T CD4+ específicos del VIH mejora su expresión de citocinas y los protege de la apoptosis.

Para infecciones resultantes de causas víricas, los anticuerpos de la invención pueden combinarse mediante
 25 aplicación simultánea con, antes o después de la aplicación de terapias convencionales para el tratamiento de infecciones víricas. Dichas terapias convencionales varían dependiendo del tipo de virus, aunque en casi todos los casos, la administración de suero humano que contiene anticuerpos (p. ej., IgA, IgG) específicos para el virus puede ser eficaz.
 30

La infección por gripe provoca fiebre, tos, mialgia, cefalea y malestar general, que con frecuencia se producen en epidemias estacionales. La gripe también se asocia con varios trastornos postinfecciosos, tales como encefalitis, miopericarditis, síndrome de Goodpasture y síndrome de Reye. La infección por gripe también suprime las defensas
 35 antibacterianas pulmonares normales, de modo que el paciente que se recupera de la gripe tiene un mayor riesgo de desarrollar neumonía bacteriana.

Las proteínas víricas de superficie de la gripe muestran variación antigénica notable, resultante de mutación y recombinación. Por tanto, los linfocitos T citolíticos son el principal vehículo del hospedador para la eliminación del virus después de la infección. La gripe se clasifica en tres tipos principales: A, B y C. La gripe A es única porque
 40 infecta tanto a seres humanos como a muchos otros animales (p. ej., cerdos, caballos, aves y focas) y es la principal causa de la gripe pandémica. Además, cuando una célula está infectada por dos cepas diferentes de gripe A, los genomas de ARN segmentados de dos tipos de virus parentales se mezclan durante la replicación para crear un replicante híbrido, lo que da como resultado nuevas cepas epidémicas. La gripe B no se replica en animales y, por tanto, tiene menos variación genética y la gripe C tiene un solo serotipo.
 45

La mayoría de las terapias convencionales son paliativas de los síntomas resultantes de la infección, mientras que la respuesta inmunitaria del hospedador elimina de hecho la enfermedad. Sin embargo, determinadas cepas (p. ej., gripe A) pueden provocar enfermedades más graves y la muerte. La gripe A puede tratarse tanto clínica como
 50 profilácticamente mediante la administración de los inhibidores de aminos cíclicas amantadina y rimantadina, que inhiben la replicación vírica. Sin embargo, la utilidad clínica de estos fármacos está limitada debido a la incidencia relativamente alta de reacciones adversas, su estrecho espectro antivírico (solo gripe A) y la propensión del virus a volverse resistente. La administración de anticuerpo IgG en suero a las principales proteínas de superficie de la gripe, la hemaglutinina y la neuraminidasa, puede prevenir la infección pulmonar, mientras que la IgA de la mucosa es necesaria para prevenir la infección de las vías respiratorias altas y la tráquea. El tratamiento actual más eficaz
 55 para la gripe es la vacunación con la administración de virus inactivado con formalina o β -propiolactona.

Después de una incubación de 9-11 días, los hospedadores infectados con el virus del sarampión desarrollan fiebre, tos, rinitis y conjuntivitis. En un periodo de 1-2 días, se desarrolla una erupción maculopapular, eritematosa, que se extiende rápidamente por todo el cuerpo. Debido a que la infección también suprime la inmunidad celular, el
 60 hospedador tiene mayor riesgo de desarrollar superinfecciones bacterianas, incluyendo otitis media, neumonía y encefalomiелitis postinfecciosa. La infección aguda se asocia con morbilidad y mortalidad significativas, especialmente en adolescentes desnutridos.

El tratamiento para el sarampión incluye la administración pasiva de IgG humana agrupada, que puede prevenir la
 65 infección en sujetos no inmunes, incluso si se proporciona hasta una semana después de la exposición.

Sin embargo, la inmunización previa con virus atenuado vivo es el tratamiento más eficaz y previene la enfermedad en más del 95 % de los inmunizados. Ya que hay un serotipo de este virus, una sola inmunización o infección normalmente da como resultado protección de por vida contra infección posterior.

5 En una pequeña proporción de hospedadores infectados, el sarampión puede convertirse en SSPE, que es un trastorno neurológico progresivo crónico resultante de una infección persistente del sistema nervioso central. El SSPE está provocado por variantes clonales del virus del sarampión con defectos que interfieren con el ensamblaje y la gemación del virión. Para estos pacientes, sería deseable la reactivación de linfocitos T con los anticuerpos de la invención para facilitar la eliminación vírica.

10 El virus de la hepatitis B (VHB) es el patógeno transmitido por la sangre más infeccioso conocido. Es una causa importante de la hepatitis aguda y crónica y carcinoma hepático, así como infección crónica para toda la vida. Después de la infección, el virus se replica en hepatocitos, que también desprenden después el antígeno de superficie HBsAg. La detección de niveles excesivos de HBsAg en suero se usa como método convencional para
15 diagnosticar una infección por hepatitis B. Una infección aguda puede resolverse o puede convertirse en una infección crónica persistente.

Los tratamientos actuales para VHB crónico incluyen interferón α , que aumenta la expresión de antígeno leucocitario humano (HLA) de clase I en la superficie de los hepatocitos, facilitando de este modo su reconocimiento por
20 linfocitos T citotóxicos. Adicionalmente, los análogos de nucleósidos ganciclovir, famciclovir y lamivudina también han demostrado cierta eficacia en el tratamiento de la infección por VHB en ensayos clínicos. Los tratamientos adicionales para VHB incluyen interferón a pegilado, adenfovir, entecavir y telbivudina. Aunque puede conferirse inmunidad pasiva mediante administración parenteral de anticuerpos séricos anti-HBsAg, la vacunación con HBsAg inactivado o recombinante también confiere resistencia a la infección. Los anticuerpos de la invención pueden
25 combinarse con tratamientos convencionales para infecciones por hepatitis B para ventaja terapéutica.

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) puede conducir a una forma crónica de la hepatitis, que da lugar a cirrosis. Aunque los síntomas son similares a infecciones resultantes de la hepatitis B, en claro contraste con el VHB, los hospedadores infectados pueden ser asintomáticos durante 10-20 años. El tratamiento para infección por VHC
30 incluye la administración de una combinación de interferón α y ribavirina. Una terapia potencial prometedora para la infección por VHC es el inhibidor de la proteasa telaprevir (VX-960). Los tratamientos adicionales incluyen: anticuerpo anti-PD-1 (MDX-1106, Medarex), bavituximab (un anticuerpo que se une a fosfatidilserina de fosfolípido aniónico de manera dependiente de B2-glucoproteína I, Peregrine Pharmaceuticals), anticuerpo o anticuerpos de proteína E2 de recubrimiento vírico anti-VPH (p. ej., ATL 6865-Ab68+Ab65, XTL Pharmaceuticals) y Civacir® (inmunoglobulina humana policlonal anti-VHC). Los anticuerpos de la invención pueden combinarse con uno o más
35 de estos tratamientos para infecciones por hepatitis C para ventaja terapéutica.

El amplio alcance de la presente invención se entiende mejor en referencia a los siguientes ejemplos. Las realizaciones específicas descritas en el presente documento se ofrecen solo a modo de ejemplo y la invención debe estar limitada por los términos de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1

Métodos generales

Se describen métodos convencionales en biología molecular. Maniatis *et al.* (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, vol. 217, Academic Press, San Diego, CA. También aparecen métodos convencionales en Ausbel *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. Nueva York, NY, que describe clonación en células bacterianas y mutagénesis de ADN (vol. 1), clonación en células de mamífero y levadura (vol. 2), glucoconjugados y expresión de proteínas (vol. 3) y bioinformática (vol. 4).

Se describen métodos para purificación de proteínas, incluyendo inmunoprecipitación, cromatografía, electroforesis, centrifugación y cristalización. Coligan *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York. Se describe análisis químico, modificación química, modificación postraduccional, producción de proteínas de fusión y glucosilación de proteínas. Véase, p. ej., Coligan *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York; Ausubel *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, págs. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; págs. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., págs. 384-391. Se describe producción, purificación y fragmentación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Coligan *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology*, vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York;
65 Harlow y Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow y Lane, mencionado anteriormente. Están disponibles técnicas convencionales para caracterizar interacciones de

ligando/receptor. Véase, p. ej., Coligan *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology*, vol. 4, John Wiley, Inc., Nueva York.

5 Están disponibles métodos para citometría de flujo, incluyendo sistemas de detección de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS®). Véase, p. ej., Owens *et al.* (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2ª ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ. Están disponibles reactivos fluorescentes adecuados para modificar ácidos nucleicos, incluyendo cebadores y sondas de ácido nucleico, polipéptidos y anticuerpos, para su uso, p. ej., como reactivos de diagnóstico. Catálogo Molecular Probes (2003),
10 Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; catálogo Sigma-Aldrich (2003), St. Louis, MO.

Se describen métodos convencionales de histología del sistema inmunitario. Véase, p. ej., Muller-Harmelink (ed.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, Nueva York, NY; Hiatt, *et al.* (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams y Wilkins, Phila, PA; Louis, *et al.* (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*,
15 McGraw-Hill, Nueva York, NY.

Están disponibles paquetes de software y bases de datos para determinar, p. ej., fragmentos antigénicos, secuencias líderes, plegamiento de proteína, dominios funcionales, sitios de glucosilación y alineaciones de secuencia. Véase, p. ej., GenBank, conjunto Vector NTI® (Informax, Inc, Bethesda, MD); paquete GCG Wisconsin (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne *et al.* (2000) *Bioinformatics* 16: 741-742; Menne *et al.* (2000) *Bioinformatics Applications Note* 16:741-742; Wren *et al.* (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.* 68: 177-181; von Heijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133: 17-21; von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14: 4683-4690.

25 Ejemplo 2

Humanización de anticuerpos anti-GITR humano

La humanización de anticuerpos se describe en general, p. ej., en las publicaciones de solicitud de patente PCT WO 2005/047324 y WO 2005/047326.

En resumen, la secuencia de aminoácidos del dominio VH no humano (p. ej., SEQ ID NO: 1-11) se compara con un grupo de cinco secuencias de aminoácidos de línea germinal de VH humana; un representante de los subgrupos IGHV1 e IGHV4 y tres representantes del subgrupo IGHV3. Los subgrupos de VH se enumeran en M.-P. Lefranc (2001) "Nomenclature of the Human Immunoglobulin Heavy (IGH) Genes", *Experimental and Clinical Immunogenetics* 18: 100-116. Las secuencias marco conservadas de la secuencia de línea germinal humana con la coincidencia más cercana se usan para construir un dominio VH humanizado.

Los anticuerpos anti-huGITR de roedor desvelados en el presente documento son todos de la subclase kappa de VL. La secuencia de aminoácidos del dominio VL no humano (p. ej., SEQ ID NO: 12-22) se compara con un grupo de cuatro secuencias de aminoácidos de línea germinal de VL kappa humana. El grupo de cuatro está compuesto por un representante de cada uno de los cuatro subgrupos de VL humanos establecidos enumerados en V. Barbie y M.-P. Lefranc (1998) "The Human Immunoglobulin Kappa Variable (IGKV) Genes and Joining (IGKJ) Segments", *Experimental and Clinical Immunogenetics* 15: 171-183 y M.-P. Lefranc (2001) "Nomenclature of the Human Immunoglobulin Kappa (IGK) Genes", *Experimental and Clinical Immunogenetics* 18: 161-174. Los cuatro subgrupos también corresponden a los cuatro subgrupos enumerados en Kabat *et al.* (1991 - 5ª ed.) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Departamento de salud y servicios sociales de los Estados Unidos, NIH Pub. 91-3242, págs. 103-130. Las secuencias marco conservadas de la secuencia de línea germinal humana con la coincidencia más cercana se usan para construir un dominio VL humanizado.

Una vez que se determinan las secuencias de aminoácidos diana de las cadenas pesada y ligera variables, pueden generarse plásmidos que codifican el anticuerpo humanizado de longitud completa. Las secuencias de plásmidos pueden alterarse usando mutagénesis de Kunkel (véase, p. ej., Kunkel T A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492) para cambiar la secuencia de ADN a las secuencias de anticuerpos humanizados diana. De manera simultánea, se puede realizar optimización de codones para proporcionar expresión potencialmente óptima.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden humanizar usando un método que identifica una secuencia de línea germinal aceptora para un anticuerpo humanizado y comprende las etapas de: a) identificar un anticuerpo no humano que tiene la actividad biológica deseada; b) determinar la secuencia de aminoácidos de dominios V_H y V_L de un anticuerpo no humano; y c) comparar la secuencia de anticuerpo no humano con un grupo de secuencias de línea germinal humana, en donde la comparación comprende las subetapas de: 1) asignar los números de restos de secuencias V no humanas según Kabat, mencionado anteriormente; 2) delinear las regiones CDR y FR en la secuencia según Kabat, mencionado anteriormente; 3) asignar una puntuación numérica predeterminada en una posición de resto específica para la que las secuencias de línea germinal de anticuerpos no humanos y humanos son idénticas; y 4) sumar todas las puntuaciones de restos para generar una puntuación total para cada secuencia de línea germinal humana; y d) identificar la secuencia de línea germinal humana con la mayor puntuación de restos

- totales como la secuencia de línea germinal aceptora. En una realización, el método comprende además las subetapas de: 5) asignar una puntuación numérica de 1 para cada posición de resto de FR para la que las secuencias de línea germinal de anticuerpos no humanos y humanos son idénticas que no se puntuó en la subetapa (3) a secuencias de línea germinal con puntuaciones de restos totales idénticos después de la subetapa (4); 6) sumar todas las puntuaciones de restos para generar una puntuación total para cada secuencia de línea germinal humana. En una realización específica, el anticuerpo no humano es específico para GITR y mejora la actividad biológica de GITR. También se proporciona en el presente documento un anticuerpo generado por el método anterior.
- 10 En una realización, el anticuerpo GITR se humaniza usando el siguiente método. En primer lugar, los dominios V_L y V_H no humanos del anticuerpo de GITR se clonan y secuencian y se determina la secuencia de aminoácidos. Después, la secuencia de V_H no humano se compara con un grupo de tres secuencias de aminoácidos de línea germinal de V_H humana. Los tres grupos contienen un representante de cada uno de los subgrupos IGHV1, IGHV3 e IGHV4. Los subgrupos de V_H se enumeran en M.-P. Lefranc, Exp. Clin. Immunogenetics, 18: 100-116 (2001).
- 15 Específicamente, la comparación con las tres secuencias de la línea germinal comienza con la asignación de números de restos a la secuencia de V_H no humana según el sistema de numeración de Kabat. Véase Kabat *et al.*, Departamento de salud y servicios sociales de los Estados Unidos, NIH Pub. 91-3242 (5ª ed., 1991). La secuencia de V_H no humana se alinea después con cada una de las tres secuencias de línea germinal humana. Ya que los genes V solo comprenden los restos de V_H 1-94, solo estos restos se tienen en cuenta en la alineación. A continuación, se definen las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y marco conservadas (FR) en la secuencia. Las CDR y FR se definen según la combinación de las definiciones proporcionadas en Kabat, *et al.*, Departamento de salud y servicios sociales de los Estados Unidos, NIH Pub. 91-3242 (5ª ed., 1991) y C. Chothia y A. M. Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987). Por lo tanto, la definición de CDR usada es los restos 26-35 para CDR1, restos 50-65 para CDR2 y CDR3 es los restos 95-102 para CDR3 del dominio V_H . La siguiente etapa consiste en asignar una puntuación numérica en la posición de resto identificado donde las secuencias no humanas y humanas son idénticas. Un ejemplo de esta puntuación se muestra en la tabla 4 a continuación.
- 25

Tabla 4		
n.º de resto	Puntuación	Motivo
24	3	Afecta a CDR-H1
27	4	Afecta a CDR-H1,3*
29	4	Afecta a CDR-H1*
34	4	Afecta a CDR-H1*
35	2	Interfaz de VH/VL
37	2	Interfaz de VH/VL
48	3	Afecta a CDR-H2
49	3	Afecta a CDR-H2
50	2	Interfaz de VH/VL
58	2	Interfaz de VH/VL
60	2	Interfaz de VH/VL
63	3	Afecta a CDR-H2
67	3	Afecta a CDR-H2
69	3	Afecta a CDR-H2
71	4	Afecta a CDR-H2*
73	3	Afecta a CDR-H1
76	3	Afecta a CDR-H1
78	3	Afecta a CDR-H1
94	4	Afecta a CDR-H3*
máx	57	

* Se ha observado que afecta a la conformación de CDR en C. Chothia *et al.*, Nature 342: 877-883, (1989).

- Después de asignar a las posiciones de restos una puntuación numérica, se suman todas las puntuaciones de restos. La secuencia de línea germinal aceptora es la que tiene la mayor puntuación total. En un caso donde dos o más secuencias de línea germinal tienen puntuaciones idénticas, después se añade 1 al total para cada posición donde las secuencias no humanas y humanas son IDÉNTICAS para los siguientes restos de FR: 1-23, 25, 36, 38-47, 66, 68, 70, 72, 74, 75, 77 y 79-93 (máx. 60). Las puntuaciones de restos se suman de nuevo y la secuencia de línea germinal aceptora es la que tiene la mayor puntuación total. Si dos o más secuencias de línea germinal aún tienen puntuaciones idénticas, cualquiera de ellas se puede usar como la secuencia de línea germinal aceptora.
- Si la secuencia de V_L es un miembro de la subclase kappa de V_L , la secuencia de V_L no humana del anticuerpo específico de GTR se compara con un grupo de cuatro secuencias de aminoácidos de línea germinal de V_L kappa humana. Las cuatro secuencias están comprendidas por un representante de cada uno de los cuatro subgrupos de V_L humanos establecidos enumerados en V. Barbie y M.-P. Lefranc, Exp. Clin. Immunogenetics 15:171-183 (1998) y M.-P. Lefranc, Exp. Clin. Immunogenetics 18: 161-174 (2001). Las cuatro secuencias también corresponden a los cuatro subgrupos enumerados en Kabat *et al.*, Departamento de salud y servicios sociales de los Estados Unidos, NIH Pub. 91-3242, págs. 103-130 (5ª ed., 1991). La comparación de la secuencia no humana con las cuatro secuencias de línea germinal comienza con la asignación de números de restos a los restos de secuencia de V_L no humana según Kabat *et al.*, Departamento de salud y servicios sociales de los Estados Unidos, NIH Pub. 91-3242 (5ª ed., 1991). Las secuencias de V_L no humanas se alinean después con cada una de las cuatro secuencias de línea germinal humana. Ya que los genes V solo comprenden los restos de V_L 1-95, solo estos restos se tienen en cuenta en la alineación. A continuación, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y marco conservadas (FR) están definidas en la secuencia. Las CDR y FR se definen según la combinación de las definiciones proporcionadas en Kabat *et al.*, Departamento de salud y servicios sociales de los Estados Unidos, NIH Pub. 91-3242 (5ª ed. 1991) y C. Chothia y A. M. Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987). Por lo tanto, la definición de CDR usada es los restos 24-34 para CDR1, restos 50-56 para CDR2 y restos 89-97 para CDR3 del dominio V_L . La siguiente etapa consiste en asignar una puntuación numérica en la posición de resto identificado donde las secuencias no humanas y humanas son idénticas. Un ejemplo de esta puntuación se muestra en la tabla 5 a continuación.

Tabla 5			
	n.º de resto	Puntuación	Motivo
	2	4	Afecta a CDR-L1,3*
	25	4	Afecta a CDR-L1*
	29	4	Afecta a CDR-L1,3*
	34	2	Interfaz de VL/VH
	43	2	Interfaz de VL/VH
	55	2	Interfaz de VL/VH
	58	3	Afecta a CDR-L2
	89	2	Interfaz de VL/VH
	91	2	Interfaz de VL/VH
	94	2	Interfaz de VL/VH
máx		27	
* Se ha observado que afecta a la conformación de CDR en C. Chothia <i>et al.</i> , Nature 342: 877-883, (1989).			

- Después de asignar a las posiciones de restos una puntuación numérica, se suman todas las puntuaciones de restos. La secuencia de línea germinal aceptora es la que tiene la mayor puntuación total. En un caso donde dos o más secuencias de línea germinal tienen puntuaciones idénticas, después se añade 1 al total para cada posición donde las secuencias no humanas y humanas son IDÉNTICAS para los siguientes restos de FR: 1-3, 5-23, 35-42, 44-49, 57, 59-88 (máx. 67). Las puntuaciones de restos se suman de nuevo y la secuencia de línea germinal aceptora es la que tiene la mayor puntuación total. Si dos o más secuencias de línea germinal aún tienen puntuaciones idénticas, cualquiera de ellas se puede usar como la secuencia de línea germinal aceptora.
- Los anticuerpos monoclonales parentales anteriores se humanizaron usando este método. Las SEQ ID NO: 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108 y 110 son las secuencias de polipéptidos de cadenas pesadas variables y las SEQ ID NO: 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 y 111 son las secuencias de las cadenas ligeras variables.

Ejemplo 3

Determinación de la constante de disociación en equilibrio (K_d) para anticuerpos anti-GITR humanos usando tecnología KinExA

5 Las constantes de disociación en equilibrio (K_d) para anticuerpos anti GITR humanos se determinan usando el instrumento KinExA 3000. Sapidyne Instruments Inc., Boise Idaho, Estados Unidos. KinExA usa el principio del método de ensayo de exclusión cinética basado en la medición de la concentración de anticuerpos que no están en complejos en una mezcla de anticuerpo, antígeno y complejo de anticuerpo-antígeno. La concentración de anticuerpo libre se mide exponiendo la mezcla con un antígeno inmovilizado en fase sólida durante un periodo de tiempo muy breve. En la práctica, esto se logra haciendo fluir la mezcla de antígeno-anticuerpo en fase de solución por partículas recubiertas de antígeno inmovilizadas en una celda de flujo. Los datos generados por el instrumento se analizan usando software personalizado. Las constantes en equilibrio se calculan usando una teoría matemática basada en los siguientes supuestos:

15 1. La unión sigue la ecuación de unión reversible para el equilibrio:

$$k_{on} [Ab] [Ag] = k_{off} [AbAg]$$

20 2. El anticuerpo y el antígeno se unen 1:1 y el anticuerpo total es igual al complejo de antígeno-anticuerpo más anticuerpo libre.

3. La señal del instrumento está relacionada linealmente con la concentración de anticuerpo libre.

25 Las partículas de PMMA (Sapidyne, Cat n.º 440198) están recubiertas con GITR biotinilado (o un fragmento del mismo, tal como el dominio extracelular) según Sapidyne "Protocol for coating PMMA particles with biotinylated ligands having short or nonexistent linker arms". Se usa PEO-biotina EZ-link TFP (Pierce, cat. n.º 21219) para biotinilación de GITR, según las recomendaciones del fabricante (Pierce bulletin 0874).

Ejemplo 4

30 Determinación de la constante de disociación en equilibrio (K_d) para anticuerpos humanizados anti-GITR humano usando tecnología BIAcore

35 Se realizan determinaciones de BIAcore esencialmente como se describe en el ejemplo 4 de la solicitud de patente de los Estados Unidos, de cesión común, relacionada, n.º 11/511.635 (presentada el 29 de agosto de 2006). En resumen, los compañeros de unión se inmovilizan en un chip sensor CM5 BIAcore usando un procedimiento de acoplamiento de amina convencional. Las constantes cinéticas para las diversas interacciones se determinan usando software BIAevaluation 3.1. La K_d se determina usando las constantes de velocidad de disociación y asociación calculadas.

40 Los anticuerpos de GITR 36E5, 3D6, 61G6, 6H6, 61F6, 1D8, 17F10, 35D8, 49A1, 9E5 y 31H6 tenían los siguientes valores de K_d :

Tabla 6: Mediciones de afinidad de anticuerpos de GITR

Analito (mAb)	Antígeno de captura	K_a (1/Ms) ($\times 10^5$)	K_d (1/s) ($\times 10^{-6}$)	K_d aparente (pM)
36E5	hGITR-hIgG	8,64	177	205
61F6	hGITR-hIgG	11,1	13530	12189
61G6	hGITR-hIgG	0,04	69	15602
3D6	hGITR-hIgG	0,95	766	8046
6H6	hGITR-hIgG	6,10	919	1507
1D8	hGITR-hIgG	4,28	196	458
17F10	hGITR-hIgG	13,1	146	111
35D8	hGITR-hIgG	8,01	200	250
49A1	hGITR-hIgG	4078	318	665
9E5	hGITR-hIgG	23,3	27	12
31H6	hGITR-hIgG	15,7	7	≤ 5

Ejemplo 5

Bioensayos para la evaluación de anticuerpos anti-GITR activadores

- 5 La capacidad de un anticuerpo monoclonal para mejorar biológicamente la actividad de GITR se evaluó por el efecto sobre la proliferación de linfocitos T vírgenes (véase, p. ej., Ito *et al.*, (2006) PNAS 103 (35): 13138-43. Se aislaron linfocitos T CD4⁺ vírgenes de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación con Ficoll, seguida de un kit de aislamiento de linfocitos T CD4 vírgenes de STEMCELL Technologies.
- 10 En placas de cultivo de fondo plano de tejido de 96 pocillos, se cultivaron conjuntamente un total de 2×10^4 linfocitos T CD4 vírgenes recién purificados con células L irradiadas que expresan CD32 en presencia de un anticuerpo anti-hGITR o el control de isotipo, que se había recubierto previamente con anti-CD3.
- 15 Las tablas 7A y 7B muestran el efecto de diversas dosis de anticuerpos anti-GITR en la proliferación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes (KM4-R63 es un anticuerpo de control de isotipo).

Tabla 7A

Conc de Ab (ng/ml)	36E5.A5		JL5.3D6		61G6.B6		6H6.C3		61F6.B9		KM4.R63	
	media	DT	media	DT	media	DT	media	DT	media	DT	media	DT
10000	83784	5854	96205	9562	135047	7362	91873	4218	93373	4099	29662	7817
2500	71843	7556	109291	21713	115725	9792	107347	6049	96296	1233	27007	4572
625	82075	6760	111455	5596	75125	5258	120374	10489	105194	5043	25503	4699
156	97139	11937	108929	5934	45588	6309	122653	7164	107643	8700	27496	4019
39,1	90331	6422	124377	26014	40075	2611	103621	2111	107473	2179	25650	197
9,8	78668	11867	79317	2260	34335	3038	59965	4439	96267	10551	24722	3890
2,4	47467	9197	43088	1264	28872	2754	35629	3144	61257	3294	24851	1945
0,61	31043	6389	33847	1985	32642	3155	30245	12806	37587	1858	29232	7135
0,15	26240	8161	30774	7303	35642	4447	33443	8983	31955	2689	26627	1010
0,04	27502	4280	33342	3656	30969	1537	38543	8259	34931	5787	31039	3042

Tabla 7B

Conc de Ab (ng/ml)	1D8.B5		35D8.B10		49A1.B1		9E5.C1		31H6.B7		17F10.B1	
	media	DT	media	DT	media	DT	media	DT	media	DT	media	DT
1000,0	--	--	97278	3127	78031	5394	83553	6596	87531	1051	89358	12570
416,7	--	--	89761	9163	86306	3807	79685	7730	86915	2652	85702	9724
173,6	90962	3417	96241	3423	93594	4229	84579	5929	96935	4442	87519	7556
72,3	102810	3353	92371	5048	96126	5395	85291	16030	98595	7374	83511	5009
30,1	112003	5405	95258	8152	95517	6187	83407	5503	94683	7610	86986	2717
12,6	115163	6429	86232	5329	86001	1893	85659	5087	90531	3957	90231	2079
5,2	98161	5423	71405	10471	72192	1776	77653	5524	79605	7438	77786	5065
2,2	78492	1831	59817	745	61053	239	69187	7450	67645	1972	73420	12592
0,9	64788	773	50713	2257	54096	2816	60922	7139	56972	4470	61950	4598
0,4	60794	5069	52287	5015	54348	1018	60105	6687	58490	582	58704	7820

Ejemplo 5

Tratamiento de tumores con anticuerpos de TGF- β y GITR

- 5 Estudios previos revelaron que la expresión génica de tumores 4T1 había aumentado los niveles de ARNm de TGF- β . Se planteó la hipótesis de que la coestimulación inmunitaria mediante agonista anti-GITR combinada con la eliminación de supresión inmunitaria mediante inhibición de la señalización de TGF- β induciría eficacia antitumoral sinérgica.
- 10 Para probar esta hipótesis, se implantaron $1,5 \times 10^5$ células tumorales 4T1 por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones Balb/C. Cuatro o siete días después de la implantación del tumor, se inyectó un anticuerpo de neutralización para TGF- β murino (1D11; Bioexpress) a $100 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ por vía subcutánea en el cuello y se repitió cada tres días para un total de 7 dosis. Se inyectó el anticuerpo agonista anti-GITR de ratón, DTA-1, los días 7, 14 y 21 a $500 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$. El volumen tumoral se midió cada tres días. Como se muestra en la tabla 8 a continuación, DTA-1 o anti-TGF- β solo tienen poco efecto por sí mismos. El tratamiento combinado induce efecto sinérgico en cualquiera de los días de inicio del tratamiento anti-TGF- β (día 4 o día 7 después de la implantación del tumor). Los valores son el volumen tumoral (mm^3).
- 15

Tabla 8: Eficacia antitumoral por anti-mGITR y/o anti-TGF- β

Después de imp. tumoral	IgG2b		DTA1			anti-TG- β (D7)			DTA1 + anti-TGF- β (D7)			anti-TGF- β (D4)			DTA1 + anti-TGF- β (D4)			
	MEDIA	DT	N	MEDIA	DT	N	MEDIA	DT	N	MEDIA	DT	N	MEDIA	DT	N	MEDIA	DT	N
Día 7	57,476	4,383	12	55,4614	5,28	12	55,7903	6,85	12	49,1208	4,24	12	54,551	6,01	10	48,432	6,80	10
Día 11	160,904	11,87	12	131,563	10,67	12	141,827	14,94	12	67,9306	5,98	12	140,118	15,54	10	70,202	3,65	10
Día 14	259,459	10,42	12	213,981	20,49	12	222,383	18,47	12	58,5907	5,01	12	193,78	26,52	10	39,651	9,522	10
Día 18	408,553	24,34	12	340,876	21,30	12	309,058	24,45	12	100,977	14,92	12	315,661	42,47	10	45,928	20,59	10
Día 21	627,802	34,23	12	519,613	29,11	12	524,622	44,18	12	185,615	16,66	12	515,88	55,56	10	92,660	45,67	10
Día 25	810,945	41,97	12	761,875	45,07	12	699,235	47,79	12	336,241	27,26	12	718,21	73,21	10	213,447	63,72	10
Día 29	1099,43	33,47	12	1006,18	39,89	12	908,552	32,36	12	511,284	32,98	12	956,36	83,12	10	382,504	94,91	10

Ejemplo 6

Tratamiento combinado de anticuerpo-radiación de tumores CT26

- 5 Se implantaron células tumorales CT26 (3×10^5) por vía subcutánea en los flancos izquierdos de ratones Balb/c. Se aplicó irradiación local (10 Gy) a tumores que crecieron hasta 300 mm^3 , después de observar que DTA-1 solo no tenía eficacia para destruir tumores. Un día después de la irradiación, se inyectó DTA-1 (500 μg) por vía subcutánea en el área del cuello y se repitió cada semana para un total de tres dosis. El volumen tumoral se midió cada dos a cinco días. En el grupo de 10 ratones que se sometieron a irradiación local y tratamiento combinado con DTA-1, 5
- 10 ratones rechazaron completamente los tumores y sobrevivieron hasta 3 meses. DTA-1 o la irradiación sola no presentaron rechazo tumoral (véase, p. ej., figura 1).

Ejemplo 7

- 15 Mapeo de epítomos de anticuerpos de GITR

Como se ha indicado anteriormente, DTA-1 es un anticuerpo agonista inducido contra GITR de ratón (véase, p. ej., Shimizu, *et al.*, mencionado anteriormente). Se ha mostrado que DTA-1 tiene potentes actividades antitumorales en modelos de cáncer en ratones (véase, p. ej., Cohen, *et al.* (2006) *Cancer Res.* 66: 4904-4912; Ramirez-Montagut, *et al.* (2006) *J. Immunol.* 176: 6434-6442; Zhou, *et al.* (2007) *J. Immunol.* 179: 7365-7375; y Ko, *et al.* (2005) *J. Exp. Med.* 202: 885-891).

20

Para determinar si los anticuerpos descritos anteriormente se unían con un epítipo de tipo DTA-1 en la proteína GITR humana, el epítipo DTA-1 se mapeó primero en la proteína GITR de ratón. Sin una estructura cristalina de GITR humano o de ratón disponible, el epítipo DTA-1 se determinó usando técnicas de mutagénesis dirigida

25 convencionales (véase, p. ej., Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 488-492) y los principios generales de modularidad de la familia de receptores de TNF (véase, p. ej., Naismith y Sprang, mencionado anteriormente).

Una vez que se determinó el epítipo de GITR de ratón reconocido por DTA-1, los restos correspondientes en GITR humano se cambiaron a los restos de ratón, confirmando de este modo unión de DTA-1 a GITR humano. A partir de esto, se determinó que el epítipo de tipo DTA-1 en GITR humano abarcaba los módulos 3 y 4 (véase figura 2) y el epítipo de GITR humano (SEQ ID NO: 89) reconocido por dos de los anticuerpos identificados anteriormente comprendía Gly⁷, Arg⁶⁵, Su⁶⁷, Lys⁸⁰, Phe⁸¹, Ser⁸² y Gln⁸⁶.

30

Ejemplo 8

Tratamiento de infecciones víricas con anticuerpos anti-GITR

La infección por VIH se caracteriza por defectos en la generación y el mantenimiento de células de memoria central. Las células de memoria central CD8⁺ tienen una semivida más corta y son menos abundantes en individuos infectados por VIH que en los controles. Además, la frecuencia de linfocitos T específicos de VIH tanto CD4⁺ como CD8⁺ disminuye rápidamente después del inicio de la terapia antirretrovírica de gran actividad (TARGA). La coestimulación en CD4⁺ por anti-GITR puede proporcionar un mecanismo para aumentar la respuesta de CD8⁺ de memoria y contribuir a la eliminación del virus. Se ha mostrado que el tratamiento de ratones infectados por virus de Friend de manera persistente con anticuerpo anti-GITR para aliviar la supresión por Treg mejoró significativamente la producción de IFN- γ por los linfocitos T CD8⁺ y permitió una reducción significativa de las cargas víricas (Dittmer *et al.*, (2004) *Immunity* 20: 293-303).

40

45

Otra característica de la infección por VIH es la apoptosis masiva de linfocitos T CD4⁺ que comienzan temprano en la infección por VIH. La supresión apoptótica progresiva de linfocitos T CD4⁺ contribuye a debilitar las respuestas inmunitarias celulares específicas del VIH y al desarrollo del SIDA. Se ha mostrado que la coestimulación con GITR mejora la secreción de citocinas específicas de antígeno murino al proteger los linfocitos T de la apoptosis. Lahey *et al.* (2007) *J Infect Dis.* 196: 43-49) demostraron que el tratamiento anti-GITR de linfocitos T CD4⁺ específicos del VIH mejora su expresión de citocinas y los protege de la apoptosis.

50

Para infecciones resultantes de causas víricas, los anticuerpos de la invención pueden combinarse mediante aplicación simultánea con, antes o después de la aplicación de terapias convencionales para el tratamiento de infecciones víricas. Dichas terapias convencionales varían dependiendo del tipo de virus, aunque en casi todos los casos, la administración de suero humano que contiene anticuerpos (p. ej., IgA, IgG) específicos para el virus puede ser eficaz.

55

60

La infección por gripe provoca fiebre, tos, mialgia, cefalea y malestar general, que con frecuencia se producen en epidemias estacionales. La gripe también se asocia con varios trastornos postinfecciosos, tales como encefalitis, miopericarditis, síndrome de Goodpasture y síndrome de Reye. La infección por gripe también suprime las defensas antibacterianas pulmonares normales, de modo que el paciente que se recupera de la gripe tiene un mayor riesgo de desarrollar neumonía bacteriana.

65

Las proteínas víricas de superficie de la gripe muestran variación antigénica notable, resultante de mutación y recombinación. Por tanto, los linfocitos T citolíticos son el principal vehículo del hospedador para la eliminación del virus después de la infección. La gripe se clasifica en tres tipos principales: A, B y C. La gripe A es única porque infecta tanto a seres humanos como a muchos otros animales (p. ej., cerdos, caballos, aves y focas) y es la principal causa de la gripe pandémica. Además, cuando una célula está infectada por dos cepas diferentes de gripe A, los genomas de ARN segmentados de dos tipos de virus parentales se mezclan durante la replicación para crear un replicante híbrido, lo que da como resultado nuevas cepas epidémicas. La gripe B no se replica en animales y, por tanto, tiene menos variación genética y la gripe C tiene un solo serotipo.

La mayoría de las terapias convencionales son paliativas de los síntomas resultantes de la infección, mientras que la respuesta inmunitaria del hospedador elimina de hecho la enfermedad. Sin embargo, determinadas cepas (p. ej., gripe A) pueden provocar enfermedades más graves y la muerte. La gripe A puede tratarse tanto clínica como profilácticamente mediante la administración de los inhibidores de aminas cíclicas amantadina y rimantadina, que inhiben la replicación vírica. Sin embargo, la utilidad clínica de estos fármacos está limitada debido a la incidencia relativamente alta de reacciones adversas, su estrecho espectro antivírico (solo gripe A) y la propensión del virus a volverse resistente. La administración de anticuerpo IgG en suero a las principales proteínas de superficie de la gripe, la hemaglutinina y la neuraminidasa, puede prevenir la infección pulmonar, mientras que la IgA de la mucosa es necesaria para prevenir la infección de las vías respiratorias altas y la tráquea. El tratamiento actual más eficaz para la gripe es la vacunación con la administración de virus inactivado con formalina o β -propiolactona.

Después de una incubación de 9-11 días, los hospedadores infectados con el virus del sarampión desarrollan fiebre, tos, rinitis y conjuntivitis. En un periodo de 1-2 días, se desarrolla una erupción maculopapular, eritematosa, que se extiende rápidamente por todo el cuerpo. Debido a que la infección también suprime la inmunidad celular, el hospedador tiene mayor riesgo de desarrollar superinfecciones bacterianas, incluyendo otitis media, neumonía y encefalomiелitis postinfecciosa. La infección aguda se asocia con morbilidad y mortalidad significativas, especialmente en adolescentes desnutridos.

El tratamiento para el sarampión incluye la administración pasiva de IgG humana agrupada, que puede prevenir la infección en sujetos no inmunes, incluso si se proporciona hasta una semana después de la exposición.

Sin embargo, la inmunización previa con virus atenuado vivo es el tratamiento más eficaz y previene la enfermedad en más del 95 % de los inmunizados. Ya que hay un serotipo de este virus, una sola inmunización o infección normalmente da como resultado protección de por vida contra infección posterior.

En una pequeña proporción de hospedadores infectados, el sarampión puede convertirse en SSPE, que es un trastorno neurológico progresivo crónico resultante de una infección persistente del sistema nervioso central. El SSPE está provocado por variantes clonales del virus del sarampión con defectos que interfieren con el ensamblaje y la gemación del virión. Para estos pacientes, sería deseable la reactivación de linfocitos T con los anticuerpos de la invención para facilitar la eliminación vírica.

El virus de la hepatitis B (VHB) es el patógeno transmitido por la sangre más infeccioso conocido. Es una causa importante de la hepatitis aguda y crónica y carcinoma hepático, así como infección crónica para toda la vida. Después de la infección, el virus se replica en hepatocitos, que también desprenden después el antígeno de superficie HBsAg. La detección de niveles excesivos de HBsAg en suero se usa como método convencional para diagnosticar una infección por hepatitis B. Una infección aguda puede resolverse o puede convertirse en una infección crónica persistente.

Los tratamientos actuales para VHB crónico incluyen interferón α , que aumenta la expresión de antígeno leucocitario humano (HLA) de clase I en la superficie de los hepatocitos, facilitando de este modo su reconocimiento por linfocitos T citotóxicos. Adicionalmente, los análogos de nucleósidos ganciclovir, famciclovir y lamivudina también han demostrado cierta eficacia en el tratamiento de la infección por VHB en ensayos clínicos. Los tratamientos adicionales para VHB incluyen interferón α pegilado, adenfovir, entecavir y telbivudina. Aunque puede conferirse inmunidad pasiva mediante administración parenteral de anticuerpos séricos anti-HBsAg, la vacunación con HBsAg inactivado o recombinante también confiere resistencia a la infección. Los anticuerpos anti-GITR de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones por hepatitis B para ventaja terapéutica.

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) puede conducir a una forma crónica de la hepatitis, que da lugar a cirrosis. Aunque los síntomas son similares a infecciones resultantes de la hepatitis B, en claro contraste con el VHB, los hospedadores infectados pueden ser asintomáticos durante 10-20 años. El tratamiento para infección por VHC incluye la administración de una combinación de interferón α y ribavirina. Una terapia potencial prometedora para la infección por VHC es el inhibidor de la proteasa telaprevir (VX-960). Los tratamientos adicionales incluyen: anticuerpo anti-PD-1 (MDX-1106, Medarex), bavituximab (un anticuerpo que se une a fosfatidilserina de fosfolípido aniónico de manera dependiente de B2-glucoproteína I, Peregrine Pharmaceuticals), anticuerpo o anticuerpos de proteína E2 de recubrimiento vírico anti-VPH (p. ej., ATL 6865-Ab68+Ab65, XTL Pharmaceuticals) y Civacir® (inmunoglobulina humana policlonal anti-VHC). Los anticuerpos anti-GITR de la invención pueden combinarse con

ES 2 788 869 T3

uno o más de estos tratamientos para infecciones por hepatitis C para ventaja terapéutica.

La tabla 9 proporciona una breve descripción de las secuencias en el listado de secuencias.

SEQ ID NO.:	Descripción
1	Variable de cadena pesada de 36E5
2	Variable de cadena pesada de 3D6
3	Variable de cadena pesada de 61G6
4	Variable de cadena pesada de 6H6
5	Variable de cadena pesada de 61F6
6	Variable de cadena pesada de 1D8
7	Variable de cadena pesada de 17F10
8	Variable de cadena pesada de 35D8
9	Variable de cadena pesada de 49A1
10	Variable de cadena pesada de 9E5
11	Variable de cadena pesada de 31H6
12	Variable de cadena ligera de 36E5
13	Variable de cadena ligera de 3D6
14	Variable de cadena ligera de 61G6
15	Variable de cadena ligera de 6H6
16	Variable de cadena ligera de 61F6
17	Variable de cadena ligera de 1D8
18	Variable de cadena ligera de 17F10
19	Variable de cadena ligera de 35D8
20	Variable de cadena ligera de 49A1
21	Variable de cadena ligera de 9E5
22	Variable de cadena ligera de 31H6
23	CDRH1 de 36E5
24	CDRH1 de 3D6
25	CDRH1 de 61G6
26	CDRH1 de 6H6
27	CDRH1 de 61F6
28	CDRH1 de 1D8
29	CDRH1 de 17F10
30	CDRH1 de 35D8
31	CDRH1 de 49A1
32	CDRH1 de 9E5
33	CDRH1 de 31H6
34	CDRH2 de 36E5
35	CDRH2 de 3D6

(continuación)

SEQ ID NO.:	Descripción
36	CDRH2 de 61G6
37	CDRH2 de 6H6
38	CDRH2 de 61F6
39	CDRH2 de 1D8
40	CDRH2 de 17F10
41	CDRH2 de 35D8
42	CDRH2 de 49A1
43	CDRH2 de 9E5
44	CDRH2 de 31H6
45	CDRH3 de 36E5
46	CDRH3 de 3D6
47	CDRH3 de 61G6
48	CDRH3 de 6H6
49	CDRH3 de 61F6
50	CDRH3 de 1D8
51	CDRH3 de 17F10
52	CDRH3 de 35D8
53	CDRH3 de 49A1
54	CDRH3 de 9E5
55	CDRH3 de 31H6
56	CDRL1 de 36E5
57	CDRL1 de 3D6
58	CDRL1 de 61G6
59	CDRL1 de 6H6
60	CDRL1 de 61F6
61	CDRL1 de 1D8
62	CDRL1 de 17F10
63	CDR L1 de 35D8
64	CDR L1 de 49A1
65	CDRL1 de 9E5
66	CDR L1 de 31H6
67	CDRL2 de 36E5
68	CDRL2 de 3D6
69	CDRL2 de 61G6
70	CDRL2 de 6H6
71	CDRL2 de 61F6
72	CDRL2 de 1D8

(continuación)

SEQ ID NO.:	Descripción
73	CDR L2 de 17F10
74	CDR L2 de 35D8
75	CDR L2 de 49A1
76	CDR L2 de 9E5
77	CDR L2 de 31H6
78	CDRL3 de 36E5
79	CDRL3 de 3D6
80	CDRL3 de 61G6
81	CDRL3 de 6H6
82	CDRL3 de 61F6
83	CDRL3 de 1D8
84	CDR L3 de 17F10
85	CDR L3 de 35D8
86	CDR L3 de 49A1
87	CDR L3 de 9E5
88	CDR L3 de 31H6
89	GITR humano
90	VH de 1D8 humanizado
91	VL de 1D8 humanizado
92	VH de 3D6 humanizado
93	VL de 3D6 humanizado
94	VH de 6H6 humanizado
95	VL de 6H6 humanizado
96	VH de 9E5 humanizado
97	VL de 9E5 humanizado
98	VH de 31H6 humanizado
99	VL de 31H6 humanizado
100	VH de 17F10 humanizado
101	VL de 17F10 humanizado
102	VH de 35D8 humanizado
103	VL de 35D8 humanizado
104	VH de 36E5 humanizado
105	VL de 36E5 humanizado
106	VH de 49A1 humanizado
107	VL de 49A1 humanizado
108	VH de 61F6 humanizado

(continuación)

SEQ ID NO.:	Descripción
109	VL de 61F6 humanizado
110	VH de 61G6 humanizado
111	VL de 61G6 humanizado

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Schebye, Xiao-Min
 Ermakov, Grigori
 Hodges, Douglas J.
 Presta, Leonard G.

10 <120> ANTICUERPOS ANTI-GITR
 <130> BP2009.6860WO

15 <150> 61/239.667
 <151> 03/09/2009

<150> 61/307.767
 <151> 24/02/2010

20 <150> 61/313.955
 <151> 15/03/2010

<160> 111

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <400> 1

ES 2 788 869 T3

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

<210> 2
 <211> 123
 5 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 2

ES 2 788 869 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile His Ala Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Ser Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Gly Ser Phe Met Tyr Ala Ala Asp Tyr Tyr Ile Met Asp Ala
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 3

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

10

ES 2 788 869 T3

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
65 70 75 80
Phe Leu Lys Ile Thr Ser Leu Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95
Cys Val Arg Ser Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

- 5 <210> 7
- <211> 117
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- 10 <400> 7

ES 2 788 869 T3

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Phe Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Ser Thr Gly Asp Arg Ser Tyr Leu Pro Asp Ser Met Lys
 50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 8
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 8

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
 35 40 45

10

ES 2 788 869 T3

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg
50 55 60

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

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

Arg Arg His Leu Gly Ser Gly Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

5

<210> 9
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 9

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Phe Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg
50 55 60

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

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

Arg Arg His Leu Ile Ser Gly Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

10

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

15

<210> 10
<211> 121
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

ES 2 788 869 T3

<400> 10

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

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

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

Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Asn Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Ile His Arg Leu Thr Val Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Ala
 65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Asn Val Asp Thr Ala Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Gln Ile Lys Glu Pro Arg Asp Trp Phe Phe Glu Phe Trp Gly
 100 105 110

Pro Gly Thr Met Val Ser Val Ser Ser
 115 120

5

<210> 11
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

10

<400> 11

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

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

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

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

Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Ala
 65 70 75 80

ES 2 788 869 T3

Phe Leu Lys Ile Thr Asn Val Asp Thr Ala Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Gln Ile Lys Glu Pro Arg Asp Trp Phe Phe Glu Phe Trp Gly
100 105 110

Pro Gly Thr Met Val Ser Val Ser Ser
115 120

5 <210> 12
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 12

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

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

Gly Val Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Glu Val Thr Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

10 Ala

15 <210> 13
<211> 113
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 13

ES 2 788 869 T3

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

Asn Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asp Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Phe Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Ser
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln His
 85 90 95

Thr His Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

5 <210> 14
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 14

ES 2 788 869 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Asn Ser Thr Val Asn Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Cys Ile Tyr
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg Ala
 100 105

<210> 15
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 15

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

Glu Arg Val Thr Val Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Met Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
 85 90 95

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

10

ES 2 788 869 T3

<210> 16
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

5

<400> 16

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

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

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Ala

10

<210> 17
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

15

<400> 17

ES 2 788 869 T3

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 115

<210> 18
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro 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 Asn Asn Phe
 20 25 30

10

ES 2 788 869 T3

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Ser Leu Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110

Pro

- <210> 19
- <211> 114
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 19

5

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

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

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

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg Arg Ala Asp Ala
 100 105 110

Ala Pro

10

- <210> 20

ES 2 788 869 T3

<211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5 <400> 20

Val Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Ile Gly
 1 5 10 15

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Arg Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Tyr Thr Pro Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala
 100 105 110

Ala Pro

10 <210> 21
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

15 <400> 21

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

Glu Arg Val Thr Ile Phe Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Asn Asn Phe
 20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Pro Leu Ile
 35 40 45

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

ES 2 788 869 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Ser Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Gly Phe Pro Asn
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro

5 <210> 22
<211> 113
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*
<400> 22

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

Glu Arg Val Thr Ile Phe Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Asn Asn Tyr
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Pro Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Ser Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Gly Phe Pro Asn
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro

10 <210> 23
<211> 10
<212> PRT
15 <213> *Mus musculus*
<400> 23

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser

ES 2 788 869 T3

		1			5					10			
5	<210> 24 <211> 10 <212> PRT <213> <i>Rattus norvegicus</i>												
10	<400> 24												
		Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Met	Ala		
		1				5					10		
15	<210> 25 <211> 11 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>												
	<400> 25												
20		Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ala	Trp	Asn	
		1				5						10	
25	<210> 26 <211> 10 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>												
	<400> 26												
30		Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr	Trp	Ile	Glu		
		1				5					10		
35	<210> 27 <211> 10 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>												
	<400> 27												
40	<210> 28 <211> 12 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>												
45	<400> 28												
		Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser	Gly	Met	Gly	Val	Gly
		1				5					10		
50	<210> 29 <211> 10 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>												

ES 2 788 869 T3

<400> 29

Gly Phe Thr Val Arg Asn Tyr Ala Met Ser
1 5 10

5 <210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

10 <400> 30

Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Trp Asn
1 5 10

15 <210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

20 <400> 31

Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Trp Asn
1 5 10

25 <210> 32
<211> 12
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 32

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

30 <210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 33

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

40 <210> 34
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

45 <400> 34

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

50 <210> 35
<211> 17

<212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 35

5

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

Gly

<210> 36
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 36

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

15

<210> 37
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20

<400> 37

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

25

<210> 38
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30

<400> 38

Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Val Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

35

<210> 39
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

40

<400> 39

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

ES 2 788 869 T3

5 <210> 40
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 40

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

10 <210> 41
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 41

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Gly
 1 5 10 15

20 <210> 42
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25 <400> 42

Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser
 1 5 10 15

30 <210> 43
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 43

35 Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Asn Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ile His
 1 5 10 15

40 <210> 44
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 44

Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
 1 5 10 15

45 <210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 45

ES 2 788 869 T3

Val Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Met Asp Tyr
 1 5 10

5 <210> 46
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 46

Gly Ser Phe Met Tyr Ala Ala Asp Tyr Tyr Ile Met Asp Ala
 1 5 10

10 <210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*
 <400> 47

Gln Leu Gly Leu Arg Phe Phe Asp Tyr
 1 5

20 <210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> *Mus musculus*
 <400> 48

Lys Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Phe
 1 5

30 <210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 35 <400> 49

Leu Gly Gly Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

40 <210> 50
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 45 <400> 50

Ser Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 1 5 10 15

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 20

ES 2 788 869 T3

5 <210> 51
<211> 20
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 51

Tyr Phe Asp Phe Asp Ser Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
1 5 10 15

Thr Val Ser Ala
20

10 <210> 52
<211> 23
<212> PRT
<213> Mus musculus

15 <400> 52

Arg His Leu Gly Ser Gly Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
1 5 10 15

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
20

20 <210> 53
<211> 23
<212> PRT
<213> Mus musculus

25 <400> 53

Arg His Leu Ile Ser Gly Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
1 5 10 15

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
20

30 <210> 54
<211> 22
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

35 <400> 54

Ile Lys Glu Pro Arg Asp Trp Phe Phe Glu Phe Trp Gly Pro Gly Thr
1 5 10 15

Met Val Ser Val Ser Ser
20

<210> 55
<211> 22

ES 2 788 869 T3

<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 55

5

Ile Lys Glu Pro Arg Asp Trp Phe Phe Glu Phe Trp Gly Pro Gly Thr
1 5 10 15

Met Val Ser Val Ser Ser
20

<210> 56
<211> 15
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10

<400> 56

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Val Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

15

<210> 57
<211> 16
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

20

<400> 57

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Asn Thr Phe Leu Ser
1 5 10 15

25

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

30

<400> 58

Ser Ala Asn Ser Thr Val Asn Tyr Met Tyr
1 5 10

35

<210> 59
<211> 12
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

40

<400> 59

Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Phe His
1 5 10

45

<210> 60
<211> 15
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

ES 2 788 869 T3

<400> 60

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn
 1 5 10 15

5 <210> 61
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 61

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

15 <210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <400> 62

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Phe Leu Asn
 1 5 10

25 <210> 63
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 63

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
 1 5 10

30 <210> 64
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 64

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Ser Ala Val Ala
 1 5 10

40 <210> 65
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

45 <400> 65

Arg Ala Ser Gln Gly Val Asn Asn Phe Leu Thr
 1 5 10

50 <210> 66
 <211> 11
 <212> PRT

ES 2 788 869 T3

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 66

Arg Ala Ser Gln Gly Val Asn Asn Tyr Leu Thr
1 5 10

5

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

10 <213> *Mus musculus*

<400> 67

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1 5

15

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

20 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 68

Leu Ala Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

25

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

30

<400> 69

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

35

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

40

<400> 70

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

45

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 71

ES 2 788 869 T3

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1 5

5 <210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 72

Lys Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

10

15 <210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 73

Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser
1 5

20

25 <210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 74

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

30 <210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

35 <400> 75

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

40 <210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

45 <400> 76

Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

50 <210> 77
<211> 7
<212> PRT

ES 2 788 869 T3

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 77

5 Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

10 <210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15 <400> 78

Gln Gln Thr Lys Glu Val Thr Trp Thr
1 5

20 <210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 79

25 Phe Gln His Thr His Leu Pro Leu Thr
1 5

30 <210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 80

Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr
1 5

35 <210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

40 <400> 81

His Gln Tyr His Arg Ser Pro Arg Thr
1 5

45 <210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

50 <400> 82

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Phe Thr
1 5

ES 2 788 869 T3

5 <210> 83
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 83

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr
 1 5

10 <210> 84
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15 <400> 84

Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro Thr
 1 5

20 <210> 85
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25 <400> 85

Gln Gln His Ser Tyr Thr Pro Pro Trp Thr
 1 5 10

30 <210> 86
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

35 <400> 86

Gln Gln His Ser Tyr Thr Pro Pro Trp Thr
 1 5 10

40 <210> 87
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 87

Gln Gln Tyr His Gly Phe Pro Asn Thr
 1 5

45 <210> 88
 <211> 9
 <212> PRT
 50 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 88

ES 2 788 869 T3

Gln Gln Tyr His Gly Phe Pro Asn Thr
1 5

5 <210> 89
<211> 241
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<221> SEÑAL
<222> (1)..(25)

<400> 89

ES 2 788 869 T3

Met Ala Gln His Gly Ala Met Gly Ala Phe Arg Ala Leu Cys Gly Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Cys Ala Leu Ser Leu Gly Gln Arg Pro Thr Gly Gly Pro
 20 25 30

Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg
 35 40 45

Cys Cys Arg Val His Thr Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu
 50 55 60

Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Met Cys Val Gln Pro Glu Phe His
 65 70 75 80

Cys Gly Asp Pro Cys Cys Thr Thr Cys Arg His His Pro Cys Pro Pro
 85 90 95

Gly Gln Gly Val Gln Ser Gln Gly Lys Phe Ser Phe Gly Phe Gln Cys
 100 105 110

Ile Asp Cys Ala Ser Gly Thr Phe Ser Gly Gly His Glu Gly His Cys
 115 120 125

Lys Pro Trp Thr Asp Cys Thr Gln Phe Gly Phe Leu Thr Val Phe Pro
 130 135 140

Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val Cys Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala
 145 150 155 160

Glu Pro Leu Gly Trp Leu Thr Val Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys
 165 170 175

Val Leu Leu Leu Thr Ser Ala Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu
 180 185 190

Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val
 195 200 205

Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu

ES 2 788 869 T3

210

215

220

Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp
 225 230 235 240

Val

5 <210> 90
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de anticuerpo humanizado

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (24)..(24)
 <223> Puede ser A o F

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (69)..(69)
 <223> Puede ser F o L

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (73)..(73)
 <223> Puede ser R o K

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (75)..(75)
 <223> Puede ser N o T

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (80)..(80)
 <223> Puede ser L o V

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (98)..(98)
 <223> Puede ser A o V

<400> 90

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Xaa Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

ES 2 788 869 T3

Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Xaa Thr Ile Ser Xaa Asp Xaa Ser Lys Asn Thr Xaa
65 70 75 80

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

Cys Xaa Arg Ser Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 91

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de anticuerpo humanizado

<400> 91

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

ES 2 788 869 T3

<210> 92
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de anticuerpo humanizado
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (97)..(97)
 <223> Puede ser A o T
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (98).. (98)
 <223> Puede ser R o T
 20
 <400> 92

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

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

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

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

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

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

 Xaa Xaa Gly Ser Phe Met Tyr Ala Ala Asp Tyr Tyr Ile Met Asp Ala
 100 105 110

 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 93
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Secuencia de anticuerpo humanizado
 30
 <400> 93

ES 2 788 869 T3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asp Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln His
 85 90 95

Thr His Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

- <210> 94
- <211> 118
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia de anticuerpo humanizado
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (48)..(48)
- 15 <223> Puede ser M o I
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (68).. (68)
- 20 <223> Puede ser V o A
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (70)..(70)
- 25 <223> Puede ser M o F
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (72)..(72)
- 30 <223> Puede ser T o A
- <400> 94

ES 2 788 869 T3

Gln 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 Ser Arg Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Xaa Thr Xaa Thr Xaa Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Lys Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 95
<211> 109
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia de anticuerpo humanizado

<220>
15 <221> VARIANTE
<222> (48)..(48)
<223> Puede ser L o W

<220>
20 <221> VARIANTE
<222> (72)..(72)
<223> Puede ser F o Y

<400> 95

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Phe His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Xaa
35 40 45

ES 2 788 869 T3

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Xaa Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
85 90 95

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

- 5 <210> 96
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Secuencia de anticuerpo humanizado
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (24)..(24)
<223> Puede ser V o F
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (50)..(50)
<223> Puede ser I o L
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (51)..(51)
<223> Puede ser G o A
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (69)..(69)
<223> Puede ser V o L
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (71)..(71)
<223> Puede ser I o V
- 40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (73)..(73)
<223> Puede ser V o K
- 45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (80)..(80)
<223> Puede ser F o A
- 50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (99)..(99)
<223> Puede ser R o Q

ES 2 788 869 T3

<400> 96

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Xaa Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Xaa Xaa Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Asn Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Ile His Arg Xaa Thr Xaa Ser Xaa Asp Thr Ser Lys Asn Gln Xaa
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Xaa Ile Lys Glu Pro Arg Asp Trp Phe Phe Glu Phe Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5

<210> 97
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Secuencia de anticuerpo humanizado

15

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (46)..(46)
 <223> Puede ser L o P

20

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (49)..(49)
 <223> Puede ser Y o F

25

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (71)..(71)
 <223> Puede ser F o Y

30

<400> 97

ES 2 788 869 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 Gly Val Asn Asn Phe
 20 25 30

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

Xaa Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Gly Phe Pro Asn
 85 90 95

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

- 5 <210> 98
- <211> 121
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia de anticuerpo humanizado

- 15 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (24)..(24)
- <223> Puede ser V o F

- 20 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (50)..(50)
- <223> Puede ser I o L

- 25 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (51)..(51)
- <223> Puede ser G o A

- 30 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (69)..(69)
- <223> Puede ser V o L

- 35 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (73)..(73)
- <223> Puede ser V o K

- <220>
- <221> VARIANTE

<222> (80)..(80)
 <223> Puede ser F o A

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (99)..(99)
 <223> Puede ser R o Q

10 <400> 98

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Xaa Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
 20 25 30

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

Trp Xaa Xaa Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Asn Arg Xaa Thr Ile Ser Xaa Asp Thr Ser Lys Asn Gln Xaa
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Xaa Ile Lys Glu Pro Arg Asp Trp Phe Phe Glu Phe Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15 <210> 99
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de anticuerpo humanizado

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (46)..(46)
 <223> Puede ser L o P

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (49)..(49)
 <223> Puede ser Y o F

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (71)..(71)
 <223> Puede ser F o Y

ES 2 788 869 T3

<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 Gly Val Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Xaa Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Gly Phe Pro Asn
85 90 95

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

5

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

10

<220>
<223> Secuencia de anticuerpo humanizado

15

<220>
<221> VARIANTE
<222> (96)..(96)
<223> Puede ser A o Q

20

<400> 100

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

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

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

ES 2 788 869 T3

Ala Ser Ile Ser Thr Gly Asp Arg Ser Tyr Leu Pro Asp Ser Met Lys
 50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 101
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de anticuerpo humanizado
 <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 Asn 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 Lys 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 His Thr Leu Pro Pro
 85 90 95

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

15 <210> 102
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de anticuerpo humanizado

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (47)..(47)
 <223> Puede ser W o Y

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (48)..(48)
 <223> Puede ser I o M

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (71)..(71)
 <223> Puede ser V o R

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (96)..(96)
 <223> Puede ser A o S

25 <400> 102

Gln Val Gln Leu Gln 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 Asp Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Xaa Xaa
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg
 50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Ser Xaa 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 Xaa
 85 90 95

Arg Arg His Leu Gly Ser Gly Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

30 <210> 103
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 788 869 T3

<223> Secuencia de anticuerpo humanizado

<220>

<221> VARIANTE

5 <222> (71)..(71)

<223> Puede ser F o Y

<400> 103

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Xaa Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Tyr Thr Pro Pro
85 90 95

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

10

<210> 104

<211> 118

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo humanizado

20 <400> 104

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

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

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

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60

ES 2 788 869 T3

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

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

Arg Val Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

- 5 <210> 105
- <211> 112
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia de anticuerpo humanizado

- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (31)..(31)
- 15 <223> Puede ser N o Q

- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (57).. (57)
- 20 <223> Puede ser N o Q

- <400> 105

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Xaa Tyr
20 25 30

Gly Val Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Xaa Gln Gly Ser Gly Ile Pro Asp
50 55 60

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

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

ES 2 788 869 T3

Glu Val Thr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

- 5 <210> 106
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia de anticuerpo humanizado
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (47)..(47)
- <223> Puede ser W o Y
- 15 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (48)..(48)
- <223> Puede ser I o M
- 20 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (67)..(67)
- <223> Puede ser V o I
- 25 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (71)..(71)
- <223> Puede ser V o R
- 30 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (78)..(78)
- <223> Puede ser F o Y
- 35 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (96)..(96)
- <223> Puede ser A o S
- 40 <400> 106

Gln Val Gln Leu Gln 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 Asp Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Xaa Xaa
 35 40 45

Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg
 50 55 60

Ser Arg Xaa Thr Ile Ser Xaa Asp Thr Ser Lys Asn Gln Xaa Ser Leu
 65 70 75 80

ES 2 788 869 T3

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa
 85 90 95

Arg Arg His Leu Ile Ser Gly Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 107
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de anticuerpo humanizado

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> Puede ser D o V
 15 <400> 107

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Tyr Thr Pro Pro
 85 90 95

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

20 <210> 108
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de anticuerpo humanizado

<220>

ES 2 788 869 T3

<221> VARIANTE
 <222> (48)..(48)
 <223> Puede ser M o I

5

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (68).. (68)
 <223> Puede ser V o A

10

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (70)..(70)
 <223> Puede ser M o L

15

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (72)..(72)
 <223> Puede ser T o A

20

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (74)..(74)
 <223> Puede ser T o K

25

<400> 108

Gln 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 Ser Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Xaa
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Val Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Xaa Thr Xaa Thr Xaa Asp Xaa Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

30

<210> 109
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 788 869 T3

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo humanizado

<400> 109

5

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 Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

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

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

Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 110

<211> 118

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo humanizado

15

<220>

<221> VARIANTE

<222> (49)..(49)

<223> Puede ser I o M

20

<220>

<221> VARIANTE

<222> (68)..(68)

<223> Puede ser V o I

25

<220>

<221> VARIANTE

<222> (72)..(72)

<223> Puede ser V o R

30

<400> 110

ES 2 788 869 T3

Gln Val Gln Leu Gln 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 Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

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

Xaa Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Xaa Thr Ile Ser Xaa Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

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

10 <220>
 <223> Secuencia de anticuerpo humanizado

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (45)..(45)
 <223> Puede ser L o P

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (46)..(46)
 <223> Puede ser L o C

<400> 111

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Asn Ser Thr Val Asn Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Xaa Xaa Ile Tyr

ES 2 788 869 T3

35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen a GITR humano, que comprenden:
 - 5 un dominio variable de cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 105; y
 - un dominio variable de cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 104.
- 10 2. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 105 en donde el aminoácido en la posición 31 es Q y el aminoácido en la posición 57 es Q; y un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 104.
- 15 3. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que son un fragmento de unión a antígeno seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂ y un díptico.
- 20 4. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de las reivindicaciones 1 o 2, producidos por el híbrido PTA-9890 depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).
- 25 5. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, que son un anticuerpo.
- 30 6. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, en donde la cadena pesada está fusionada con una región constante de cadena pesada humana γ1.
- 35 7. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, que comprenden una región constante de cadena pesada humana γ1 o una variante de la misma, en donde la variante de región constante comprende hasta 20 sustituciones de aminoácidos modificadas de manera conservadora.
8. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, que comprenden una región constante de cadena pesada humana γ4 o una variante de la misma, en donde la variante de región constante comprende hasta 20 sustituciones de aminoácidos modificadas de manera conservadora.
- 40 9. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 45 10. Un ácido nucleico que codifica el dominio variable de cadena ligera y el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
11. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 10 unido operativamente a secuencias de control de la expresión que son reconocidas por una célula hospedadora cuando la célula hospedadora es transfectada con el vector.
- 50 12. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 11.
- 55 13. La célula hospedadora de la reivindicación 12 que es una célula de ovario de hámster chino o una célula de *Pichia pastoris*.
- 60 14. Un método para producir un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen a GITR humano que comprende: cultivar la célula hospedadora de las reivindicaciones 12 o 13 en un medio de cultivo en condiciones en donde se expresa la secuencia de ácido nucleico, produciendo de este modo el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo que comprenden los dominios variables de cadenas ligera y pesada codificados; y recuperar el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la célula hospedadora o del medio de cultivo.
- 65 15. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen a GITR humano, que se pueden obtener por el método de la reivindicación 14.
16. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o 15 para su uso en un método de tratamiento de un sujeto humano mediante terapia.
17. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de la reivindicación 16, en donde la

terapia es mediante la mejora de una respuesta inmunitaria en un sujeto humano.

- 5 18. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de las reivindicaciones 16 o 17, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se administran conjuntamente con un segundo agente terapéutico.
19. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de la reivindicación 18, en donde el segundo agente terapéutico es un anticuerpo.
- 10 20. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de la reivindicación 18, en donde el segundo agente terapéutico es un anticuerpo anti-TGFβ.
21. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de las reivindicaciones 16 o 17, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno se administran conjuntamente con radiación local.
- 15 22. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de la reivindicación 18, en donde el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en tiotepa, busulfán, improsulfán, pipsulfán, benzodopa, carbocadona, meturedopa, uredopa, altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida, trimetilolmelamina, bulatacina, butalacina, camptotecina, topotecán, briostatina, calistatina, CC-1065, criptoficina 1, criptoficina 8, dolastatina, duocarmicina, KW-2189, CB 1-TM1, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, espongiostatina, clorambucilo, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo, carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina, calicheamicina, calicheamicina gamma II, calicheamicina omega II, dinemicina, dinemicina A, clodronato, cromóforo de neocarzinostatina, aclacinomisin, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolinodoxorrubicina, desoxicodorrubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomycin, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina, 5-fluorouracilo (5-FU), denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina, calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona, aminoglutetimida, mitotano, trilostano, ácido frofínico, aceglatona, glucósido de aldofosfamida, ácido aminolevulínico, eniluracilo, amsacrina, bestrabucilo, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diazicua, elformitina, acetato de eliptinio, epotilona, etoglúcido, nitrato de galio, hidroxurea, lentinano, lonidamina, maitansina, ansamitocinas, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarrubicina, losoxantrona, ácido podofilínico, 2-etilhidracida, procarbazona, razoxano, rizoxina, sizofurano, espirogermanio, ácido tenuazónico, triazicua, 2,2',2"-trichlorotrietilamina, toxina T-2, verracurina A, roridina A, anguidina, uretano, vindesina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobromano, gacitosina, arabinósido, ciclofosfamida, paclitaxel, una formulación de paclitaxel de nanopartículas modificadas por ingeniería de albúmina, sin cremofor, docetaxel, clorambucilo, gemcitabina, 6-tioguanina, mercaptopurina, metotrexato, cisplatino, carboplatino, vinblastina, platino, etopósido, ifosfamida, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, novantrona, tenipósido, edatraxato, daunomicina, aminopterina, capecitabina, ibandronato, CPT-11, RFS2000, difluorometilomina (DMFO), ácido retinoico, tamoxifeno, raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, toremifeno, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol, exemestano, formestano, fadrozol, vorozol, letrozol, anastrozol, flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprorelina, goserelina, troxacitabina, angiozima, alovectina, leuvectina, vaxid, IL-2 recombinante, lurtotecán y abarelix.
- 50 23. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de la reivindicación 18, en donde el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente alquilante, una etilenimina, una metilamelamina, una acetogenina, una camptotecina, una criptoficina, una sarcodictina, un antibiótico, un bisfosfonato, una mitomicina, un antimetabolito, un análogo de ácido fólico, un análogo de purina, un andrógeno, un antiadrenal, un reabastecedor de ácido fólico, una epotilona, un tricoteceno, un taxoide, un retinoide, un agente antihormonal, un inhibidor de aromatasa, un antiandrógeno, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, un inhibidor de la expresión de HER2 y una vacuna.
- 60 24. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de la reivindicación 17, en donde la respuesta inmunitaria es contra un trastorno proliferativo.
25. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de la reivindicación 17, en donde la respuesta inmunitaria es contra el cáncer.
- 65 26. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de la reivindicación 25, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en adenocarcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de páncreas, glioblastoma, glioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de

ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio, mieloma, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, carcinoma de células basales, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer de esófago y cáncer de cabeza y cuello.

- 5 27. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de la reivindicación 17, en donde la respuesta inmunitaria es contra una infección vírica.
- 10 28. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de la reivindicación 27, en donde la infección vírica es provocada por un virus que se selecciona del grupo que consiste en virus del papiloma humano (VPH), virus del herpes simple, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del sarampión, virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y virus de Epstein Barr (EBV).

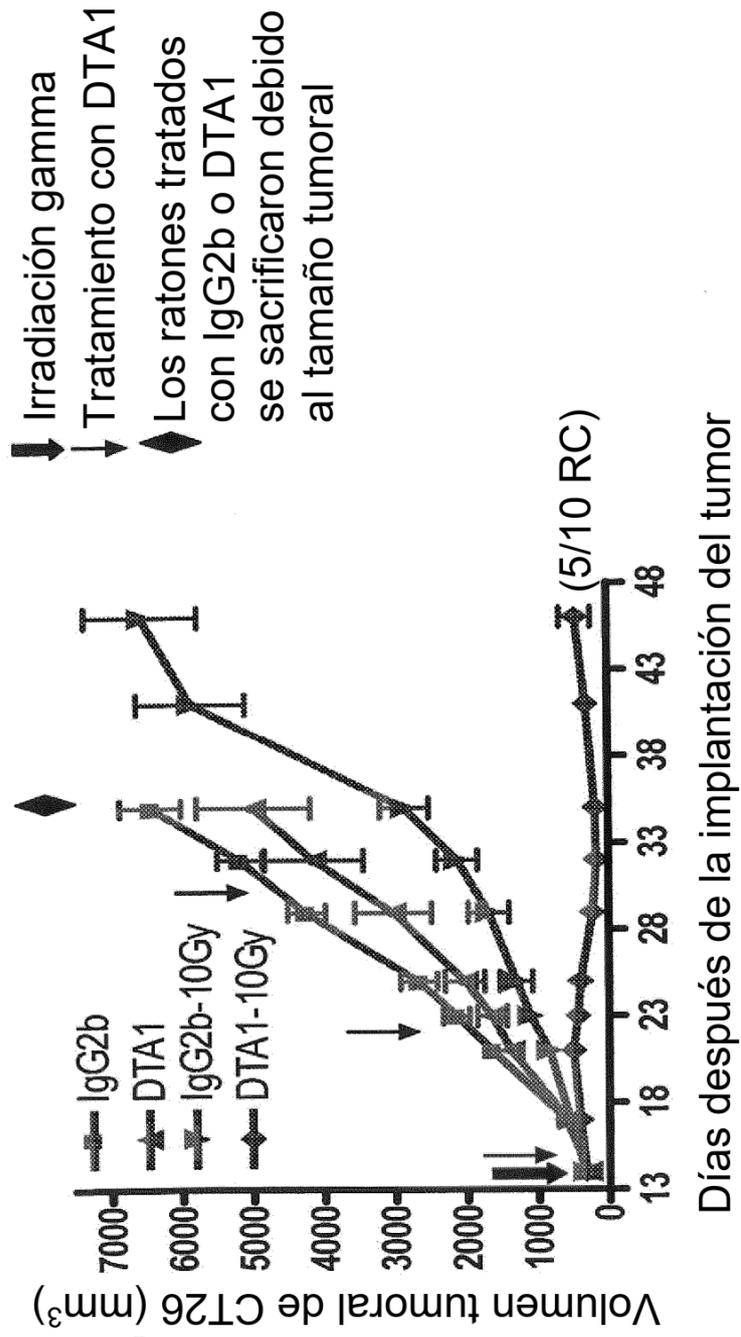


FIGURA 1

ES 2 788 869 T3

1 9 24 25 47
QRPTGGPG CGPGRLLLGTGTDARC CRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDC M
| --- Módulo 1 --- | | ----- Módulo 2 ----- |

49 64 69 87
CVQPEFHCGDPCCTTC RHHP CPPGQGVQSOGKFSFGFQC ID
| --- Módulo 3 --- | | ----- Módulo 4 ----- |

90 103 109 128
CASGTFSGGHEGHC KPWTD CTQFGFLTVPFGNKTHNAVC
| -- Módulo 5 --- | | ----- Módulo 6 ----- |

VPGSPPAEPLGWLTVVLLAVAACVLLL TSAQLGLHIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPSTEDA

216
RSCQFPPEERGERSAEEKGRLGDLWV

FIGURA 2