PCT

CSA125535

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

10-86027

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

CSA125531

Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda

**SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN**

**TITULO:** MOLECULAS DE UNIÓN AL RECEPTOR OX40 HUMANO

**SOLICITANTE:** BRSITOL-MYERS SQUIBB COMPANY y PFIZER INC.

**DIRECCIÓN:** 1) Route 206 & Province Line Rd. Princeton, NJ 08540 E.U.A. y 2) 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 E.U.A

**APODERADO:** CARLOS R. OLARTE

**BOGOTÁ** 14 de Julio de 2010

P2010/000074

# OLARTERAISBECK

OLARTE RAISBECK MOI

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-086027- -00000-0000

Fecha 2010-07-14 16:56:43 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTES II Clase: 378 PASE NACIONAL
Act: 411 PRESENTACION Folios: 243

**PETITORIO - FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD**
**PATENTE PCT**
**ENTRADA EN FASE NACIONAL** **P2010/000074**

**SOLICITUD DE:**

(1) [X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) **SOLICITANTE (71)**

**Nombre:** **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY y PFIZER INC.**
**Dirección:** Route 206 & Province Line Rd. Princeton, NJ 08540 y 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 E.U.A
**Nacionalidad o Domicilio:** Estadounidenses
**Lugar de Constitución:** Estados Unidos de América.
**Teléfono:** _____ **Fax:** _____
**E-mail:** _____

**IDENTIFICACIÓN**
**C.C.** [ ] **NIT** [ ]
**C.E.** [ ] **Otro** [ ]
**Cual** _____
**Número** _____

**REPRESENTANTE O APODERADO**

**Nombre:** CARLOS R. OLARTE
**Dirección:** Diagonal 34 No. 5-28 Bogotá D.C.
**Teléfono:** 601-7700 **Fax:** 601-7799
**E-mail:** office@olarteraisbeck.com

**IDENTIFICACIÓN**
**C.C.** [X] **NIT** [ ]
**C.E.** [ ] **Otro** [ ]
**Cual** _____
**Número** 79782747Bta
**TP** 74.295

**INVENTOR (ES) (72)**

**Nombre:** VER PAGINA ADJUNTA
**Dirección:** VER PAGINA ADJUNTA
**Nacionalidad O Domicilio:** VER PAGINA ADJUNTA

(5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/086417 Fecha Diciembre 11, 2008

Publicación Internacional No. WO 2009/079335 Fecha Junio 25, 2009

(6) **Título (54)** **MOLECULAS DE UNIÓN AL RECEPTOR OX40 HUMANO** (Folo 248)

**Clasificación Internacional (51)** C07K 16/28, A61P 35/00

**Prioridad** **SI** [X] **NO** [ ]

| (33) País de Origen | (32) Fecha | (31) Número de Solicitud |
|---|---|---|
| US | Diciembre 14, 2007 | 61/013,947 |
| | | |
| | | |
| | | |

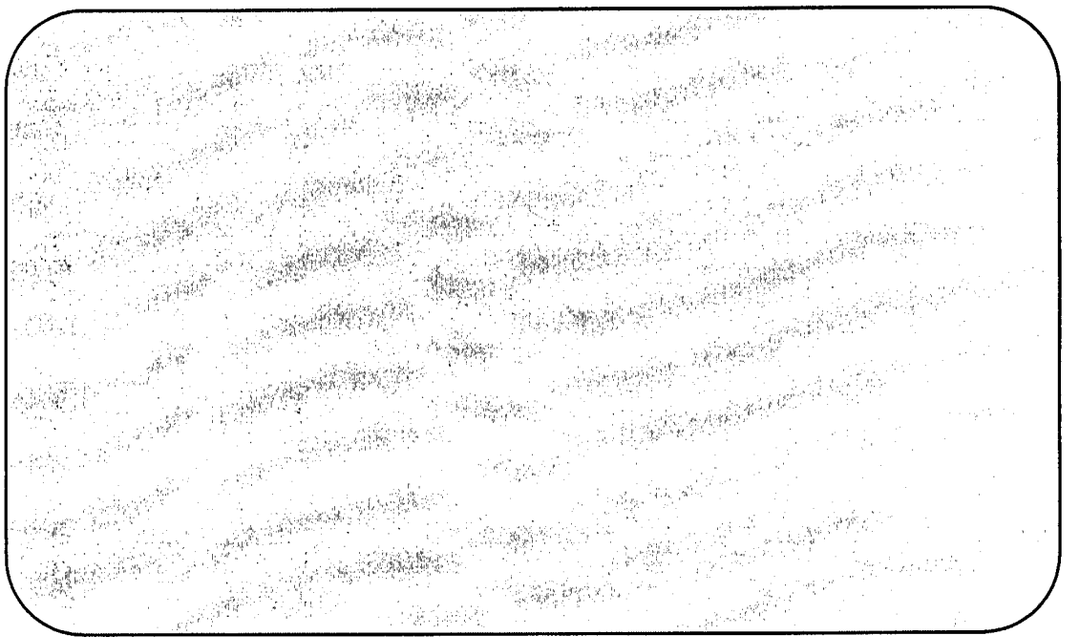
(9) **Comprobante de pago No.** 10- **Fecha** Julio 14 de 2010

2

## (10) ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver Expediente No. SD-147.462
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12 x 12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional. Formulario PCT/IB/306
- [x] Otros. Búsqueda Internacional

## (11) FIGURA CARACTERÍSTICA:



- [ ] Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

C.C. 79.782.747 Bta T.P. 74.295

# LISTA DE INVENTORES
**PCT/US2008/086417**

**JING MIN**
15309 Noosing Tree Court,
Chesterfield, MO63017
Estado unido de America
Nacionalidad: Estado unudense

**YANLI WU**
1352 Kiefer Bluffs Drive, Ballwin,
MO 63021
Estado unido de America
Nacionalidad: Canadiense

**RORY FRANCIS FINN**
976 Sunburst Court,
Manchester, MO 63021
Estado unido de America
Nacionalidad: Estado unudense

**BARRETT RICHARD THIELE**
5619 Dantonaire Place, Saint,
Louis, MO 63128
Estado unido de America
Nacionalidad: Estado unudense

**WEI LAIO**
17143 Hillcrest Meadow Drive,
Chesterfield, MO 63005
Estado unido de America
Nacionalidad: Estado unudense

**RONALD PAUL GLADUE**
83 Rowley Drive, Stonington,
CT 06378
Estado unido de America
Nacionalidad: Estado unudense

**ARVIND RAJPAL**
519 Foerster Street, San
Francisco, CA 94127
Estado unido de America
Nacionalidad: Estado unudense

**TIMOTHY JOSEPH PARADIS**
5 Beaver River Road, Richmond,
RI 02892
Estado unido de America
Nacionalidad: Estado unudense

**PETER BRAMS**
2740 11th Avenue, Sacramento,
CA 95815
Estado unido de America
Nacionalidad: Alemana

**BRIGITTE DEVAUX**
320 Duluth Circle Palo Alto,
CA 94306
Estado unido de America
Nacionalidad: Estado unudense

**YI WU**
1339 Kennedy Drive, Milpitas,
CA 95035
Estado unido de America
Nacionalidad: Estado unudense

**KRISTOPHER TOY**
1694 Ambergrove Drive, San Jose,
CA 95131
Estado unido de America
Nacionalidad: Estado unudense

**HEIDI N. LEBLANC**
649 Church Street, Mountain
View, CA 94041
Estado unido de America
Nacionalidad: Canadiense

**HAICHUN HUANG**
4329 Crestwood Street, Fremont,
CA 94538
Estado unido de America
Nacionalidad: Estado unudense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 57,720
FECHA : JULIO 14 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-086027- -00000-0000
Fecha 2010-07-14 16:56:43 Dep: 2020 DIR NUEVAS CR
Tra 11 PATENTES II Lve 378 PASE NACIONAL I
Act 411 PRESENTACION Folios 243

***** C O N S I G N A C I O N *****

| DEPOSITANTE | TIPO PAGO | BANCO | CUENTA | No. PAGO | FECHA PGO | Vr. PAGO |
|---|---|---|---|---|---|---|
| OLARTE RAISBEK | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 353318361 | 14/07/2010 | 554,000.00 |

***** C O N C E P T O *****

| CANT. | RENTISTICO | CONCEPTO | TOTAL CONCEPTO |
|---|---|---|---|
| 1 | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 554,000.00 |
| | | TOTAL : $ | 554,000.00 |

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
25 June 2009 (25.06.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/079335 A1

(51) International Patent Classification:
*C07K 16/28* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/086417

(22) International Filing Date:
11 December 2008 (11.12.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/013,947 14 December 2007 (14.12.2007) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **MEDAREX, INC.** [US/US]; 707 State Road, Princeton, NJ 08540 (US). **PFIZER INC.** [US/US]; 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **MIN, Jing** [US/US]; 15309 Nooning Tree Court, Chesterfield, MO 63017 (US). **WU, Yanli** [CA/US]; 1352 Kiefer Bluffs Drive, Ballwin, MO 63021 (US). **FINN, Rory, Francis** [US/US]; 976 Sunburst Court, Manchester, MO 63021 (US). **THIELE, Barrett, Richard** [US/US]; 5619 Dantonnaire Place, Saint Louis, MO 63128 (US). **LAIO, Wei** [US/US]; 17143 Hillcrest Meadow Drive, Chesterfield, MO 63005 (US). **GLADUE, Ronald, Paul** [US/US]; 33 Rowley Drive, Stonington, CT 06378 (US). **RAJPAL, Arvind** [US/US]; 519 Foerster Street, San Francisco, CA 94127 (US). **PARADIS, Timothy, Joseph** [US/US]; 5 Beaver River Road, Richmond, RI 02892 (US). **BRAMS, Peter** [DE/US]; 2740 11th Avenue, Sacramento, CA 95815 (US). **DEVAUX, Brigitte** [US/US]; 320 Duluth Circle, Palo Alto, CA 94306 (US). **WU, Yi** [US/US]; 1339 Kennedy Drive, Milpitas, CA 95035 (US). **TOY, Kristopher** [US/US]; 1694 Ambergrove Drive, San Jose, CA 95131 (US). **LEBLANC, Heidi, N.** [CA/US]; 649 Church Street, Mountain View, CA 94041 (US). **HUANG, Haichun** [US/US]; 4339 Crestwood Street, Fremont, CA 94538 (US).

(74) Agent: **BRADY, James, W.**; Dickstein Shapiro LLp, 1825 Eye Street, NW, Washington, DC 20006-5403 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Published:**
— *with international search report*
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*
— *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

(54) Title: BINDING MOLECULES TO THE HUMAN OX40 RECEPTOR

(57) Abstract: The present disclosure provides isolated binding molecules that bind to the human OX40R, nucleic acid molecules encoding an amino acid sequence of the binding molecules, vectors comprising the nucleic acid molecules, host cells containing the vectors, methods of making the binding molecules, pharmaceutical compositions containing the binding molecules, and methods of using the binding molecules or compositions.

WO 2009/079335 A1

# BINDING MOLECULES TO THE HUMAN OX40 RECEPTOR

**[0001]** This application claims the benefit of United States Provisional Application No. 61/013947 filed on 14 December 2007, which is incorporated herein by reference in its entity.

## JOINT RESEARCH AGREEMENT

**[0002]** The disclosure and claims herein were made as a result of activities undertaken within the scope of a joint research agreement in effect on or before the date the claimed invention was made between Pfizer Inc. and Medarex, Inc.

## BACKGROUND

**[0003]** The present disclosure relates to antibodies, and particularly to antibodies that bind to the OX40 receptor.

**[0004]** Enhancing anti-tumor T cell function represents a powerful and novel approach for cancer treatment. Crucial components involved with generating an effective anti-tumor T cell response include enhancing CD4+ helper T cell activity to promote the generation of anti-tumor cytolytic T cells, and providing survival signals for memory and effector T cells. A key receptor that has been shown to mediate these responses is the OX40 receptor. Sugamura, K., Ishii, N., Weinberg, A. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX-40. Nature Rev. Imm. 4: 420-431 (2004); Hori, T. Roles of OX40 in the pathogenesis and control of diseases. Intn. J. Hematology. 83: 17-22 (2006).

**[0005]** The OX40 receptor (OX40R) (also known as CD134, TNFRSF4, ACT-4, ACT35, and TXGP1L) is a member of the TNF receptor superfamily. The OX40R is found to be expressed on activated CD4+ T-cells. High numbers of OX40R+ T cells have been demonstrated within tumors (tumor infiltrating lymphocytes) and in the draining lymph nodes of cancer patients (Vetto, J.T. et al. 1997. Presence of the T-cell activation marker OX-40 on tumor infiltrating lymphocytes and draining lymph nodes cells from patients with melanoma and head

9

and neck cancers. Am. J. Surg. 174: 258-265; Weinberg, A.D. et al. Engagement of the OX-40 receptor in vivo enhances antitumor immunity. J. Immunol. 164: 2160-69 (2000); Petty, J.K., et al. Survival in human colorectal cancer correlates with expression of the T-cell costimulatory molecule OX-40 (CD134). Am. J. Surg. 183: 512-518 (2002)). It was shown in tumor models in mice that engagement of the OX40R *in vivo* during tumor priming significantly delayed and prevented the appearance of tumors as compared to control treated mice (Weinberg et al., 2000). Therefore, it has been contemplated to enhance the immune response of a mammal to an antigen by engaging the OX40R through the use of an OX40R binding agent (WO 99/42585; Weinberg et al., 2000).

## SUMMARY

**[0006]** The present disclosure provides isolated binding molecules that bind to the human OX40R, including OX40R antibodies, antigen-binding fragments of the OX40R antibodies, and derivatives of the OX40R antibodies. In some embodiments the binding molecule binds to the human OX40R with a $K_D$ of $1 \times 10^{-7}$ M or less and has agonist activity on the human OX40R. In some further embodiments, the binding molecule is a human monoclonal antibody that specifically binds to the human OX40R with a $K_D$ of 100 nM or less.

**[0007]** The present disclosure also provides a composition that comprises one or more of the binding molecules and a pharmaceutically acceptable carrier. In some embodiments, the binding molecule is a human monoclonal OX40R antibody or an antigen-binding fragment thereof. The composition may further comprise additional pharmaceutical agents, such as chemotherapeutic agents, immunotherapeutic agents, and hormonal therapeutic agents.

**[0008]** The present disclosure further provides therapeutic and diagnostic methods using the binding molecules. In some embodiments, the disclosure provides a method of treating or preventing cancer in a mammal, comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of a binding molecule or a composition comprising a binding molecule. In some other embodiments, the disclosure provides a method of enhancing an immune response in a mammal, comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of a binding molecule or a composition comprising a binding molecule. In

10

some particular embodiments the binding molecule used in the methods is a human monoclonal OX40R antibody or an antigen-binding fragment thereof.

**[0009]** The present disclosure further provides nucleic acid molecules that encode an amino acid sequence of a binding molecule, vectors comprising such nucleic acids, host cells compricing the vectors, and methods of preparing the binding molecules.

**[0010]** The disclosure also provides other aspects, which will be apparent from the entire disclosure, including the claims.

## BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

**[0011]** Figures 1a and 1b are graphs showing that antibody 11D4 specifically binds to the OX40R;

**[0012]** Figure 2 is a graph showing the effect of cross-linked antibody 11D4 on OX40R-stimulated luciferase activity;

**[0013]** Figure 3 is a graph showing the effect of antibody 11D4 on IL-2 production by alloantigen primed T cells;

**[0014]** Figure 4 is a graph showing the effect of antibody 11D4 on anti-CD3 induced IL-2 production by primary T cells;

**[0015]** Figure 5 is a graph showing the effect of antibody 11D4 on anti-CD3 induced IL-2 production by cynomolgus primary T cells;

**[0016]** Figure 6 shows the saturation binding curves with antibody 11D4 using cynomolgus PBMC's from 14 donors stimulated with anti-CD3 and anti-CD28;

**[0017]** Figure 7 shows the saturation binding curves with antibody 11D4 using human PBMC's from 17 donors stimulated with anti-CD3 and anti-CD28;

**[0018]** Figure 8 is a graph showing the effect of antibody 11D4 on the growth of B cell lymphoma Raji in SCID mice;

**[0019]** Figure 9 is a graph showing the effect of antibody 11D4 on the growth of B cell lymphoma Raji 21 days after tumor injection;

11

[0020] Figure 10 is a graph showing the effects of a single injection of antibody 11D4 on the growth of the prostate tumor PC-3 in SCID mice;

[0021] Figure 11 is a graph showing the effect of antibody 11D4 on the growth of the prostate tumor PC-3 in SCID mice 27 days after tumor injection;

[0022] Figure 12 is a graph showing the effect of antibody 11D4 on the growth of the colon carcinoma LOVO in SCID mice;

[0023] Figure 13 is a graph showing the effect of antibody 11D4 on the growth of the colon carcinoma LOVO in SCID mice 25 days after tumor injection;

[0024] Figure 14 is a graph showing the effect of antibody 11D4 on the growth of the breast tumor BT474 in SCID mice; and

[0025] Figure 15 is a graph showing the effect of antibody 11D4 on the growth of the breast tumor BT474 in SCID mice.

## DETAILED DESCRIPTION

### DEFINITIONS

[0026] The term "agonist" refers to a binding molecule, as defined herein, which upon binding to the OX40R, (1) stimulates or activates the OX40R, (2) enhances, increases, promotes, induces, or prolongs an activity, function, or presence of the OX40R, or (3) enhances, increases, promotes, or induces the expression of the OX40R.

[0027] The term "antibody" refers to an immunoglobulin molecule that is typically composed of two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one "light" (L) chain and one "heavy" (H) chain. Human light chains are classified as kappa and lambda light chains. Heavy chains are classified as mu, delta, gamma, alpha, or epsilon, and define the antibody's isotype as IgM, IgD, IgG, IgA, and IgE, respectively. Within light and heavy chains, the variable and constant regions are joined by a "J" region of about 12 or more amino acids, with the heavy chain also including a "D" region of about 3 or more amino acids. Each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (abbreviated herein as HCVR or $V_H$) and a heavy chain constant region. The heavy chain constant region is comprised of three

12

domains, $C_H1$, $C_H2$ and $C_H3$. Each light chain is comprised of a light chain variable region (abbreviated herein as LCVR or $V_L$) and a light chain constant region. The light chain constant region is comprised of one domain, CL. The constant regions of the antibodies may mediate the binding of the immunoglobulin to host tissues or factors, including various cells of the immune system (e.g., effector cells) and the first component (C1q) of the classical complement system. The $V_H$ and $V_L$ regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementarity determining regions (CDR), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions (FR). Each $V_H$ and $V_L$ is composed of three CDRs and four FRs, arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. The variable regions of each heavy/light chain pair ($V_H$ and $V_L$), respectively, form the antibody binding site. The assignment of amino acids to each region or domain is in accordance with the definitions of Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), or Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342:878-883. The term "antibody" encompasses an antibody that is part of an antibody multimer (a multimeric form of antibodies), such as dimers, trimers, or higher-order multimers of monomeric antibodies. It also encompasses an antibody that is linked or attached to, or otherwise physically or functionally associated with, a non-antibody moiety. Further, the term "antibody" is not limited by any particular method of producing the antibody. For example, it includes, inter alia, recombinant antibodies, monoclonal antibodies, and polyclonal antibodies.

**[0028]** The term "antibody derivative" or "derivative" of an antibody refers to a molecule that is capable of binding to the same antigen (e.g., OX40R) that the antibody binds to and comprises an amino acid sequence of the antibody linked to an additional molecular entity. The amino acid sequence of the antibody that is contained in the antibody derivative may be the full-length antibody, or may be any portion or portions of a full-length antibody. The additional molecular entity may be a chemical or biological molecule. Examples of additional molecular entities include chemical groups, amino acids, peptides, proteins (such as enzymes, antibodies), and chemical compounds. The additional molecular entity may have any utility, such as for use as a detection agent, label, marker, pharmaceutical or therapeutic agent. The

amino acid sequence of an antibody may be attached or linked to the additional entity by chemical coupling, genetic fusion, noncovalent association or otherwise. The term "antibody derivative" also encompasses chimeric antibodies, humanized antibodies, and molecules that are derived from modifications of the amino acid sequences of an OX40R antibody, such as conservation amino acid substitutions, additions, and insertions.

**[0029]** The term "antigen-binding fragment" of an antibody refers to one or more portions of a full-length antibody that retain the ability to bind to the same antigen (e.g., OX40R) that the antibody binds to. The term "antigen-binding fragment" also encompasses the portion of an antibody that is part of a larger molecule formed by covalent or noncovalent association of the antibody portion with one or more additional molecular entities. Examples of additional molecular entities include amino acids, peptides, or proteins, such as the streptavidin core region, which may be used to make a tetrameric scFv molecule (Kipriyanov et al., (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101), a cysteine residue, a marker peptide, or a C-terminal polyhistidine tag, which may be used to make bivalent and biotinylated scFv molecules (Kipriyanov et al., (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058).

**[0030]** The term "binding molecule" encompasses (1) antibody, (2) antigen-binding fragment of an antibody, and (3) derivative of an antibody, each as defined herein.

**[0031]** The term "binds to OX40R" or "binding to OX40R" refers to the binding of a binding molecule, as defined herein, to the OX40R in an *in vitro* assay, such as a BIAcore assay. Binding means a binding affinity ($K_D$) of $1 \times 10^{-6}$ M or less.

**[0032]** The term "chimeric antibody" refers to an antibody that comprises amino acid sequences derived from two or more different antibodies. The two or more different antibodies may be from the same species or from two or more different species.

**[0033]** The term "conservative amino acid substitution" refers to substitution of an amino acid residue by another amino acid residue, wherein the side chain R groups of the two amino acid residues have similar chemical properties

(e.g., charge or hydrophobicity). Examples of groups of amino acids that have side chains with similar chemical properties include 1) aliphatic side chains: glycine, alanine, valine, leucine, and isoleucine; 2) aliphatic-hydroxyl side chains: serine and threonine; 3) amide-containing side chains: asparagine and glutamine; 4) aromatic side chains: phenylalanine, tyrosine, and tryptophan; 5) basic side chains: lysine, arginine, and histidine; 6) acidic side chains: aspartic acid and glutamic acid; and 7) sulfur-containing side chains: cysteine and methionine. Conservative amino acid substitution groups can be, for example, valine-leucine-isoleucine, phenylalanine-tyrosine, lysine-arginine, alanine-valine, glutamate-aspartate, and asparagine-glutamine.

**[0034]** The term "epitope" refers to the part of an antigen that is capable of specific binding to an antibody, or T-cell receptor, or otherwise interacting with a molecule. "Epitope" is also known in the art as "antigenic determinant." An epitope generally consists of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids or carbohydrate or sugar side chains and generally have specific three dimensional structural characteristics, as well as specific charge characteristics. An epitope may be "linear" or "conformational." Once a desired epitope on an antigen is determined, antibodies to that epitope can be generated, e.g., using the techniques described herein. The generation and characterization of antibodies may also elucidate information about desirable epitopes. From this information, it is then possible to competitively screen antibodies for binding to the same epitope. An approach to achieve this is to conduct cross-competition studies to find antibodies that competitively bind with one another, i.e., the antibodies compete for binding to the antigen. A high throughput process for "binning" antibodies based upon their cross-competition is described in PCT Publication No. WO 03/48731.

**[0035]** The term "germline" refers to the nucleotide sequences of the antibody genes and gene segments as they are passed from parents to offspring via the germ cells. The germline sequence is distinguished from the nucleotide sequences encoding antibodies in mature B cells which have been altered by recombination and hypermutation events during the course of B cell maturation.

**[0036]** The term " host cell" refers to a cell into which an expression vector has been introduced. The term encompasses not only the particular subject cell

15

but also the progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term "host cell." The term "human antibody" refers to an antibody consisting of amino acid sequences of human immunoglobulin sequences only. A human antibody may contain murine carbohydrate chains if produced in a mouse, in a mouse cell or in a hybridoma derived from a mouse cell. Human antibodies may be prepared in a variety of ways known in the art.

**[0037]** The term "humanized antibody" refers to a chimeric antibody that contains amino acid residues derived from human antibody sequences. A humanized antibody may contain some or all of the CDRs from a non-human animal antibody while the framework and constant regions of the antibody contain amino acid residues derived from human antibody sequences.

**[0038]** The term "mammal" refers to any animal species of the Mammalia class. Examples of mammals include: humans; laboratory animals such as rats, mice, simians and guinea pigs; domestic animals such as cats, dogs, rabbits, cattle, sheep, goats, horses, and pigs; and captive wild animals such as lions, tigers, elephants, and the like.

**[0039]** The term "isolated nucleic acid" refers to a nucleic acid molecule of genomic, cDNA, or synthetic origin, or a combination thereof, which is separated from other nucleic acid molecules present in the natural source of the nucleic acid. For example, with regard to genomic DNA, the term "isolated" includes nucleic acid molecules which are separated from the chromosome with which the genomic DNA is naturally associated. Preferably, an "isolated" nucleic acid is free of sequences which naturally flank the nucleic acid (i.e., sequences located at the 5' and 3' ends of the nucleic acid of interest) in the genomic DNA of the organism from which the nucleic acid is derived.

**[0040]** The term "isolated antibody" or "isolated binding molecule" refers to an antibody or a binding molecule that: (1) is not associated with naturally associated components that accompany it in its native state; (2) is free of other proteins from the same species; (3) is expressed by a cell from a different species; or

(4) does not occur in nature. Examples of isolated antibodies include an OX40R antibody that has been affinity purified using OX40R, an OX40R antibody that has been generated by hybridomas or other cell line in vitro, and a human OX40R antibody derived from a transgenic animal.

**[0041]** The term "$K_D$" refers to the equilibrium dissociation constant of a particular antibody-antigen interaction and is used to describe the binding affinity between a ligand (such as an antibody) and a protein (such as the OX40R). The smaller the equilibrium dissociation constant, the more tightly bound the ligand is, or the higher the affinity between ligand and protein. A $K_D$ can be measured by surface plasmon resonance, for example using the BIACORE™ system. An assay procedure using the BIACORE™ system (BIAcore assay) is described in the Examples section of this disclosure.

**[0042]** The term "off rate" or "kd" refers to the dissociation rate constant of a particular antibody-antigen interaction. A dissociation rate constant can be measured by surface plasmon resonance, for example using the BIACORE™.

**[0043]** The term "OX40R antibody" refers to an antibody, as defined herein, capable of binding to the human OX40R.

**[0044]** The terms "OX40 receptor" and "OX40R" are used interchangeably in the present application, and include the human OX40R, as well as variants, isoforms, and species homologs thereof. Accordingly, human binding molecules disclosed herein may, in certain cases, also bind to the OX40R from species other than human. In other cases, the binding molecules may be completely specific for the human OX40R and may not exhibit species or other types of cross-reactivity.

**[0045]** The term "specifically bind to the human OX40R" in reference to the interaction of a binding molecule, e.g., an antibody, with its binding partner, e.g., an antigen, means that the $K_D$ of a binding molecule for binding to CD40, CD137, or CD27l is more than 100 fold the $K_D$ for its binding to the human OX40R, as determined in an *in vitro* assay.

[0046] The term "vector" refers to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid molecule in a host cell. Examples of vectors include plasmids, viral vectors, naked DNA or RNA expression vectors, cosmid or phage vectors. Some vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (e.g., bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Some vectors can be integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome (e.g., non-episomal mammalian vectors). Certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked, and therefore may be referred to as "expression vectors."

[0047] As used herein, the twenty conventional amino acids and their abbreviations follow conventional usage. See Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.F. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, MA (1991)).

[0048] BINDING MOLECULES THAT BIND TO THE HUMAN OX40R

[0049] The present disclosure provides isolated binding molecules that bind to the human OX40R, including OX40R antibodies, antigen-binding fragments of the OX40R antibodies, and derivatives of the OX40R antibodies. The binding molecules are characterized by at least one of the following functional properties: (a) bind to the human OX40R with a $K_D$ of $1 \times 10^{-6}$ M or less; (b) have agonist activity on the human OX40R; (c) do not bind to CD40 receptor at concentration up to 500 nM; (d) do not bind to CD137 receptor at concentrations up to 500 nM; (e) do not bind to CD271 receptor at concentrations up to 500 nM; (f) are capable of enhancing IL-2 production by isolated human T cells; (g) are capable of enhancing immune response; (h) are capable of inhibiting tumor cell growth; and (i) have therapeutic effect on a cancer. In some embodiments the binding molecule binds to the human OX40R with a $K_D$ of $1 \times 10^{-7}$ M or less, or $1 \times 10^{-8}$ M or less, or $5 \times 1 \times 10^{-9}$ M or less.

[0050] Human OX40R Antibodies

[0051] In some first aspects, the present disclosure provides a human antibody that binds to the human OX40P. In some embodiments, the human antibody is a monoclonal antibody that specifically binds to the human OX40P with a $K_D$ of 100 nM or less, preferably 10 nM or less, and has agonist activity on the human OX40P. One example of such human antibodies is the human monoclonal antibody 11D4. The amino acid sequence of the heavy chain and amino acid sequence of the variable region of the heavy chain ($V_H$) of antiboduy 11D4 are shown in SEQ ID NOs: 9 and 7, respectively. The amino acid sequence of the light chain and the amino acid sequence of the variable region of the light chain ($V_L$) of antibody 11D4 are shown in SEQ ID NOS: 10 and 8, respectively. The isotypes of antibody 11D4 are IgG2 for the heavy chain and Kappa for the light chain. The allotypes of antibody 11D4 are G2(n-) for the heavy chain and Km3 for the light chain. The mature heavy and light chain amino acid sequences are derived from conceptual translation of DNA sequences in the expression constructs. Antibody 11D4 contains no framework mutations in the heavy chain or light chain, but contains one mutation in the heavy chain CDR2.

[0052] Another illustrative antibody of the disclosure is the human monoclonal antibody 18D8. The amino acid sequence of the $V_H$ region and $V_L$ region of antibody 18D8 is shown in SEQ ID NOs: 19 and 20, respectively. The amino acid sequence of the heavy chain and light chain is shown in SEQ ID NOS: 21 and 22, respectively.

[0053] Given that 11D4 and 18D8 bind to the OX40P, the $V_H$ and $V_L$ sequences of each of them can be "mixed and matched" with other OX40P antibodies to create additional antibodies. The binding of such "mixed and matched" antibodies to the OX40P can be tested using the binding assays known in the art, including an assay described in the Examples. In one case, when $V_H$ and $V_L$ regions are mixed and matched, a $V_H$ sequence from a particular $V_H/V_L$ pairing is replaced with a structurally similar $V_H$ sequence. Likewise, in another case a $V_L$ sequence from a particular $V_H/V_L$ pairing is replaced with a structurally similar $V_L$ sequence.

[0054] Accordingly, in some embodiments, the disclosure provides an isolated OX40P antibody that comprises: (1) a heavy chain variable region of antibody 11D4 or 18D8, (2) a heavy chain variable region comprising an amino acid

sequence of SEQ ID NOs: 7 or 19, or (3) a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence encoded by a nucleic acid sequence of SEQ ID NOs: 11 or 23. In some other embodiments, the disclosure provides an isolated OX40R antibody that comprises: (1) a light chain variable region of antibody 11D4 or 18D8, (2) a light chain variable region comprising an amino acid sequence of SEQ ID NOs: 8 or 20, or (3) light chain variable region comprising an amino acid sequence encoded by a nucleic acid sequence of SEQ ID NOs: 12 or 24.

**[0055]** In another aspect, the disclosure provides antibodies that comprise the CDR1, CDR2, and CDR3 of the heavy chain variable region ($V_H$) and CDR1, CDR2, and CDR3 of the light chain of 11D4 or 11D8. The amino acid sequence of the $V_H$ CDR1, $V_H$ CDR2, and $V_H$ CDR3 of 11D4 is shown in SEQ ID NOs: 1, 2, and 3, respectivelly. The amino acid sequence of the $V_L$ CDR1, $V_L$ CDR2, and $V_L$ CDR3 of antibody 11D4 is shown in SEQ ID NOs: 4, 5, and 6, respectivelly. The amino acid sequence of the $V_H$ CDR1, $V_H$ CDR2, and $V_H$ CDR3 of antibody 18D8 is shown in SEQ ID NOs: 13, 14, and 15, respectively. The amino acid sequence of the $V_L$ CDR1, $V_L$ CDR2, and $V_L$ CDR3 of antibody 18D8 is shown in SEQ ID NOs: 16, 17, and 18, respectivelly. The CDR regions are delineated using the Kabat system (Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

**[0056]** Given that 11D4 and 18D8 bind to the human OX40R and that antigen-binding specificity is provided primarily by the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, the $V_H$ CDR1, CDR2, and CDR3 sequences and $V_L$ CDR1, CDR2, and CDR3 sequences can be "mixed and matched" to create additional OX40R antibodies. For example, CDRs from different OX40R antibodies can be mixed and matched, although each antibody will typically contain a $V_H$ CDR1, CDR2, and CDR3 and a $V_L$ CDR1, CDR2, and CDR3. The binding of such "mixed and matched" antibodies to the OX40R can be tested using the binding assays described above and in the Examples (e.g., ELISAs, Biacore analysis). In one case, when $V_H$ CDR sequences are mixed and matched, the CDR1, CDR2 and/or CDR3 sequence from a particular $V_H$ sequence is replaced with a structurally similar CDR sequence(s). Likewise, when $V_L$ CDR sequences are mixed and matched, the CDR1, CDR2 and/or CDR3 sequence

from a particular $V_L$ sequence typically is replaced with a structurally similar CDR sequence(s). It will be readily apparent to an ordinarily skilled artisan that novel $V_H$ and $V_L$ sequences can be created by substituting one or more $V_H$ and/or $V_L$ CDR region sequences with structurally similar sequences from the CDR sequences disclosed herein.

**[0057]** Accordingly, in some embodiments, the disclosure provides (1) an isolated monoclonal antibody that comprises at least one CDR selected from $V_H$ CDR1, $V_H$ CDR2, or $V_H$ CDR3 of antibody 11D4 or 18D8. In some other embodiments, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody that comprises at least one CDR selected from $V_L$ CDR1, $V_L$ CDR2 or $V_L$ CDR3 of antibody 11D4 or 18D8. In some further embodiments, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody that comprises at least one CDR selected from: a $V_H$ CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NOs: 1 or 13, or a sequence that differs from SEQ ID NOs: 1 or 3 by 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; a $V_H$ CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NOs: 2 or 14 or a sequence that differs from SEQ ID NOs: 2 or 14 by 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; and a $V_H$ CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NOs: 3 or 15 or a sequence that differs from SEQ ID NOs: 3 or 15 by 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions.

**[0058]** In still some further embodiments, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody that comprises at least one CDR selected from: a $V_L$ CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NOs: 4 or 16 or a sequence that differs from SEQ ID NOs: 4 or 16 by 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; a $V_L$ CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NOs: 5 or 17 or a sequence that differs from SEQ ID NOs: 5 or 17 by 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; and a $V_L$ CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NOs: 6 or 18 or a sequence that differs from SEQ ID NOs: 6 or 18 by 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions.

**[0059]** In some cases, the C-terminal lysine of the heavy chain of an OX40R antibody is cleaved (Harris R. J., *J. of Chromatography*, 705: 129-134 (1995)). The heavy and/or light chain(s) of the OX40R antibodies may optionally include a signal sequence.

21

**[0060]** The class (e.g., IgG, IgM, IgE, IgA, or IgD) and subclass (e.g., IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4) of the OX40R antibodies may be determined by any suitable method. In general, the class and subclass of an antibody may be determined using antibodies that are specific for a particular class and subclass of antibody. Such antibodies are commercially available. The class and subclass can be determined by ELISA, or Western Blot as well as other techniques. Alternatively, the class and subclass may be determined by sequencing all or a portion of the constant domains of the heavy and/or light chains of the antibodies, comparing their amino acid sequences to the known amino acid sequences of various class and subclasses of immunoglobulins, and determining the class and subclass of the antibodies. The OX40R antibodies can be an IgG, an IgM, an IgE, an IgA, or an IgD molecule. For example, the OX40R antibodies can be an IgG that is an IgG1, IgG2, IgG3, or an IgG4 subclass. Thus, another aspect of the disclosure provides a method for converting the class or subclass of an OX40R antibody to another class or subclass. In some cases, a nucleic acid molecule encoding a $V_L$ or $V_H$ that does not include sequences encoding $C_L$ or $C_H$ is isolated using methods well-known in the art. The nucleic acid molecule then is operatively linked to a nucleic acid sequence encoding a $C_L$ or $C_H$ from a desired immunoglobulin class or subclass. This can be achieved using a vector or nucleic acid molecule that comprises a $C_L$ or $C_H$ chain, as described above. For example, an OX40R antibody that was originally IgM can be class switched to an IgG. Further, the class switching may be used to convert one IgG subclass to another, e.g., from IgG1 to IgG2. Another method for producing an antibody comprising a desired isotype comprises the steps of isolating a nucleic acid encoding a heavy chain of an OX40R antibody and a nucleic acid encoding a light chain of an OX40R antibody, isolating the sequence encoding the $V_H$ region, ligating the $V_H$ sequence to a sequence encoding a heavy chain constant domain of the desired isotype, expressing the light chain gene and the heavy chain construct in a cell, and collecting the OX40R antibody with the desired isotype.

**[0061]** Antigen-binding Fragments

**[0062]** In another aspect, the present disclosure provides antigen-binding fragments of any of the human OX40R antibodies as described herein above. In some embodiments, the antigen-binding fragment is selected from: (1) a light chain

of an OX40R antibody; (2) a heavy chain of an OX40R antibody; (3) a variable region from the light chain of an OX40R antibody; (4) a variable region from the heavy chain of an OX40R antibody; (5) one or more CDRs (two, three, four, five, or six CDRs) of an OX40R antibody; or (6) three CDRs from the light chain and three CDRs from the heavy chain of an OX40R antibody. In some particular embodiments, the disclosure provides an antigen-binding fragment of antibody 11D4 or 18D8. In some other particular embodiments, the antigen-binding fragments of an OX40R antibody include: (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the $V_L$, $V_H$, $C_L$ and $C_H1$ domains; (ii) a $F(ab')_2$ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) a Fd fragment consisting of the $V_H$ and $C_H1$ domains; (iv) a Fv fragment consisting of the $V_L$ and $V_H$ domains of a single arm of an antibody; (v) a dAb fragment (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), which consists of a $V_H$ domain; (vi) an isolated CDR, and (vii) single chain antibody (scFv), which is a polypeptide comprising a VL region of an antibody linked to a VH region of an antibody. Bird et al., (1988) Science 242:423-426 and Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883. An antigen-binding fragment may also comprise two or more shorter fragments, either from the same heavy chain or same light chain, or from different chains. Antigen-binding fragments, such as Fab and $F(ab')_2$ fragments, can be prepared from whole antibodies using conventional techniques, such as papain or pepsin digestion, respectively, of whole antibodies. They can also be obtained using recombinant DNA techniques, as described herein.

**[0063]** Antibody Derivatives

**[0064]** In some further aspects, the present disclosure provides derivatives of any of the OX40R antibodies as described herein above.

**[0065]** In one particular aspect, the antibody derivative is derived from modifications of the amino acid sequences of 11D4 or 18D8. Amino acid sequences of any regions of the antibody chains may be modified, such as framework regions, CDR regions, or constant regions. The modifications can be introduced by standard techniques known in the art, such as site-directed mutagenesis and random PCR-mediated mutagenesis, and may comprise natural as well as non-natural amino acids.

[0066] Types of modifications include substitutions, insertions, deletions, or combinations thereof, of one or more amino acids of an OX40R antibody. In some embodiments, the antibody derivative comprises 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions in the heavy chain CDRs and/or one amino acid substitution in the light chain CDRs. In some embodiments, a derivative of an OX40R antibody comprises one or more amino acid substitutions relative to the germline amino acid sequence of the human gene. In a particular embodiment, one or more of those substitutions from germline is in the CDR2 region of the heavy chain. In another particular embodiment, the amino acid substitutions relative to the germline are at one or more of the same positions as the substitutions relative to germline in antibodies 11D4 or 18D8. In another embodiment, the amino acid substitution is to change one or more cysteines in an antibody to another residue, such as, without limitation, alanine or serine. The cysteine may be a canonical or non-canonical cysteine. The substitution can be made in a CDR or framework region of a variable domain or in the constant domain of an antibody. Another type of amino acid substitution is to eliminate asparagine-glycine pairs, which form potential deamidation sites, by altering one or both of the residues. In still other embodiments, the amino acid substitution is a conservative amino acid substitution. In one embodiment, the antibody derivative has 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions in the heavy chain CDR regions relative to the amino acid sequences of 11D4 or 18D8.

[0067] Another type of modification of an OX40R antibody is the alteration of the original glycosylation pattern of the antibody. The term "alteration" refers to deletion of one or more carbohydrate moieties found in the antibody, and/or adding one or more glycosylation sites that are not present in the antibody. Glycosylation of antibodies is typically N-linked. N-linked refers to the attachment of the carbohydrate moiety to the side chain of an asparagine residue. Addition of glycosylation sites to the antibody is conveniently accomplished by altering the amino acid sequence such that it contains one or more of the above-described tripeptide sequences (for N-linked glycosylation sites).

[0068] Still another type of modification involves removal of any carbohydrate moieties present on the antibody which may be accomplished chemically or enzymatically. Chemical deglycosylation requires exposure of the

antibody to a compound, such as trifluoromethanesulfonic acid, or an equivalent compound. This treatment results in the cleavage of most or all sugars except the linking sugar (N-acetylglucosamine or N-acetylgalactosamine), while leaving the antibody intact. Chemical deglycosylation is described by Sojahr, H. T., and Bahl, O. P., Arch. Biochem. Biophys. 259 (1987) 52-57 and by Edge, A. S., et al. Anal. Biochem. 118 (1981) 131-137. Enzymatic cleavage of carbohydrate moieties on antibodies can be achieved by the use of a variety of endo- and exo-glycosidases as described by Thotakura, N. P., and Bahl, O. P., Meth. Enzymol. 138 (1987) 350-359.

**[0069]** Examples of other modifications include acetylation, acylation, amidation, cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, formation of covalent cross-links, formation of cystine, formylation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, pegylation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, and sulfation.

**[0070]** In a further aspect, there is provided an antibody derivative that comprises an OX40R antibody, or antigen-binding fragment thereof, as described herein, linked to an additional molecular entity. Examples of additional molecular entities include pharmaceutical agents, peptides or proteins, and detection agent or labels. Specific examples of pharmaceutical agents that may be linked to an OX40R antibody include cytotoxic agents or other cancer therapeutic agents, and radioactive isotopes. Specific examples of peptides or proteins that may be linked to an OX40R antibody include antibodies, which may be the same OX40R antibody or a different antibody. Specific examples of detection agents or labels that may be linked to an OX40R antibody include (1) fluorescent compounds, such as fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, 5-dimethylamine-1-naphthalenesulfonyl chloride, phycoerythrin, and lanthanide phosphors; (2) enzymes, such as horseradish peroxidase, β-galactosidase, luciferase, alkaline phosphatase, and glucose oxidase; (3) biotin; (4) a predetermined polypeptide epitope recognized by a secondary reporter, such as leucine zipper pair sequences, binding sites for secondary antibodies, metal binding domains, and epitope tags. In a particular embodiment, the antibody derivative is an OX40R antibody multimer, which is a multimeric form of an OX40R antibody, such as antibody dimers, trimers, or higher-order multimers of monomeric antibodies. Individual monomers within an antibody multimer may be identical or

different, i.e., they may be heteromeric or homomeric antibody multimers. Individual antibodies within a multimer may have the same or different binding specificities. Multimerization of antibodies may be accomplished through natural aggregation of antibodies. For example, some percentage of purified antibody preparations (e.g., purified IgG1 molecules) spontaneously form protein aggregates containing antibody homodimers, and other higher-order antibody multimers. Alternatively, antibody homodimers may be formed through chemical linkage techniques known in the art, such as through using heterobifunctional crosslinking agents. Suitable crosslinkers include those that are heterobifunctional, having two distinctly reactive groups separated by an appropriate spacer (such as m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester, succinimidyl 4-(maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate, and N-succinimidyl S-acethylthio-acetate) or homobifunctional (such as disuccinimidyl suberate). Such linkers are commercially available from Pierce Chemical Company, Rockford, IL. Antibodies can also be made to multimerize through recombinant DNA techniques known in the art.

**[0071]** In still another aspect, the antibody derivative is a chimeric antibody, which comprises an amino acid sequence of a human OX40R antibody described herein above. In one example, one or more CDRs from a human OX40R antibody is combined with CDRs from an antibody from a non-human animal, such as mouse or rat. In another example, all of the CDRs of the chimeric antibody are derived from human OX40R antibodies. In another example, the CDRs from more than one human OX40R antibody are combined in a chimeric antibody. Further, a chimeric antibody may comprise the framework regions derived from one human OX40R antibody and one or more CDRs from one or more different human antibodies. Chimeric antibodies can be generated using conventional methods known in the art. In some particular embodiments, the chimeric antibody comprises one, two, or three CDRs from the heavy chain variable region or from the light chain variable region of an antibody selected from antibody 11D4 or 18D8.

**[0072]** Examples of other antibody derivatives provided by the present disclosure include single chain antibodies, diabodies, domain antibodies, nanobodies, and unibodies. A "single-chain antibody" (scFv) consists of a single polypeptide

chain comprising a $V_L$ domain linked to a $V_H$ domain wherein $V_L$ domain and $V_H$ domain are paired to form a monovalent molecule. Single chain antibody can be prepared according to method known in the art (see, for example, Bird et al., (1988) Science 242:423-426 and Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). A "diabody" consists of two chains, each chain comprising a heavy chain variable region connected to a light chain variable region on the same polypeptide chain connected by a short peptide linker, wherein the two regions on the same chain do not pair with each other but with complementary domains on the other chain to form a bispecific molecule. Methods of preparing diabodies are known in the art (See, e.g., Holliger P. et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, and Poljak R. J. et al., (1994) Structure 2:1121-1123). Domain antibodies (dAbs) are small functional binding units of antibodies, corresponding to the variable regions of either the heavy or light chains of antibodies. Domain antibodies are well expressed in bacterial, yeast, and mammalian cell systems. Further details of domain antibodies and methods of production thereof are known in the art (see, for example, U.S. Patent Nos. 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; 6,172,197; 6,696,245; European Patents 0368684 & 0616640; WO05/035572, WO04/101790, WO04/081026, WO04/058821, WO04/003019 and WO03/002609. Nanobodies are derived from the heavy chains of an antibody. A nanobody typically comprises a single variable domain and two constant domains (CH2 and CH3) and retains antigen-binding capacity of the original antibody. Nanobodies can be prepared by methods known in the art (See e.g., U.S. Patent No. 6,765,087, U.S. Patent No. 6,838,254, WO 06/079372). Unibodies consist of one light chain and one heavy chain of a IgG4 antibody. Unibodies may be made by the removal of the hinge region of IgG4 antibodies. Further details of unibodies and methods of preparing them may be found in WO2007/059782.

**[0073]** METHODS OF PRODUCING THE BINDING MOLECULES

**[0074]** Binding molecules as disclosed herein can be produced by techniques known in the art, including conventional monoclonal antibody methodology, e.g., the standard somatic cell hybridization technique of Kohler and Milstein (Nature 256: 495, (1975)), as well as other techniques such as viral or oncogenic transformation of B lymphocytes.

**[0075]** Immunization of Non-human Animals

**[0076]** The disclosure also provides a method for making OX40R antibodies or antigen-binding fragments thereof, which comprises immunizing a non-human animal that comprises human immunoglobulin loci with an OX40R antigen, and isolating the antibody from the immunized animal or from cells derived from the immunized animal.

**[0077]** Examples of suitable non-human animals include a transgenic or transchromosomic animal, such as HuMAb Mouse®, KM Mouse®, "TC mice," and Xenomouse™. The HuMAb Mouse® (Medarex, Inc.) contains human immunoglobulin gene miniloci that encode unrearranged human heavy (μ and γ) and κ light chain immunoglobulin sequences, together with targeted mutations that inactivate the endogenous μ and κ chain loci (see e.g., Lonberg, et al. (1994) Nature 368: 856-859). Accordingly, the mice exhibit reduced expression of mouse IgM or κ, and in response to immunization, the introduced human heavy and light chain transgenes undergo class switching and somatic mutation to generate high affinity human IgGκ monoclonal antibodies (See, e.g., Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546). Preparation and use of the HuMAb Mouse®, and the genomic modifications carried by such mice, is well known in the art (See, e.g., Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851). The KM mice™ carry a human heavy chain transgene and a human light chain transchromosome and are described in detail in WO 02/43478. The Xenomouse™ (Abgenix, Inc.) contains large fragments of the human immunoglobulin loci and is deficient in mouse antibody production. This animal model is well known in the art (See, e.g., U.S. Patent Nos.: 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584; and 6,162,963). "TC mice" are also engineered mice carrying both a human heavy chain transchromosome and a human light chain transchromosome. Such mice are described in Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727.

**[0078]** The OX40R antigen for use to immunize the animal may be isolated and/or purified OX40R and is preferably a human OX40R. In one embodiment, the OX40R antigen is a fragment of the human OX40R, preferably the extracellular domain of the OX40R. In another embodiment, the OX40R antigen is a fragment that comprises at least one epitope of the human OX40R. In another embodiment, the OX40R antigen is a cell that expresses OX40R on its cell surface,

more particularly a cell that overexpresses the OX40P on its cell surface. Immunization of the animals may be done by any suitable method known in the art. (See, e.g., Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990). Particular methods for immunizing non-human animals such as mice, rats, sheep, goats, pigs, cattle and horses are well known in the art (See, e.g., Harlow and Lane (1990); U.S. Pat. No. 5,994,619). Example 1 provides a method for immunizing HuMab mice.

**[0079]** After immunization of the animal with an OX40P antigen, antibodies and/or antibody-producing cells can be obtained from the animal. In one embodiment, serum is obtained from the animal and an immunoglobulin fraction may be obtained from the serum, or the OX40P antibodies may be purified from the serum.

**[0080]** The OX40P antibodies may also be produced using antibody-producing immortalized cells prepared from cells isolated from the immunized animal. After immunization, the lymph node and/or splenic B cells are collected from the animal and immortalized by suitable means. Methods of immortalizing cells include, but are not limited to, transfecting them with oncogenes, infecting them with an oncogenic virus and cultivating them under conditions that select for immortalized cells, subjecting them to carcinogenic or mutating compounds, fusing them with an immortalized cell, e.g., a myeloma cell, and inactivating a tumor suppressor gene (See, e.g., Harlow and Lane, supra). In a particular embodiment, the splenic B cells collected from the immunized animal are fused to immortalized myeloma cells to form antibody-producing immortalized hybridomas. The myeloma cells preferably do not secrete immunoglobulin polypeptides (a non-secretory cell line). Immortalized hybridomas are screened using the OX40 antigen (e.g., the OX40P, a portion thereof, or a cell expressing the OX40P). The initial screening may be performed, for example, using an enzyme-linked immunoassay (ELISA) or a radioimmunoassay. An example of ELISA screening is described in WO 00/37504.

**[0081]** The OX40P antibody-producing cells, e.g., hybridomas, are selected, cloned, and further screened for desirable characteristics, including robust growth, high antibody production, and desirable antibody characteristics, as discussed

further below. Hybridomas can be expanded *in vivo* in syngeneic animals, in animals that lack an immune system, e.g., nude mice, or in cell culture *in vitro*.

**[0082]** Thus, methods are provided for producing a cell that produces a human monoclonal OX40R antibody or an antigen-binding fragment thereof, comprising: (a) immunizing a non-human transgenic animal with an OX40R antigen; (b) allowing the animal to mount an immune response to the OX40R antigen; (c) isolating antibody-producing cells from the animal; and (d) immortalizing the antibody-producing cells. In one embodiment, the method further comprises (e) creating individual monoclonal populations of the immortalized antibody-producing cells; and (f) screening the immortalized antibody-producing cells that produce a desired OX40R antibody.

**[0083]** NUCLEIC ACIDS, VECTORS, HOST CELLS, AND RECOMBINANT METHODS OF PRODUCING OX40R ANTIBODIES

**[0084]** Another aspect of the disclosure provides an isolated nucleic acid molecule encoding an amino acid sequence of a binding molecule that binds the human OX40R. The amino acid sequence encoded by the nucleic acid molecule may be any portion of an intact antibody, such as a CDR, a sequence comprising one, two, or three CDRs, or a variable region of a heavy chain or light chain, or may be a full-length heavy chain or light chain. In some embodiments, the nucleic acid molecule encodes an amino acid sequence that comprises (1) a CDR3 region, particularly a heavy chain CDR3 region, of antibodies 11D4 or 18D8; (2) a variable region of a heavy chain or variable region of a light chain of antibodies 11D4 or 18D8; or (3) a heavy chain or a light chain of antibodies 11D4 or 18D8. In other embodiments, the nucleic acid molecule encodes a polypeptide that comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, and 22. In still other embodiments, the nucleic acid molecule is selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 11, 12, 23, and 24.

**[0085]** The nucleic acid molecules provided by the disclosure may be obtained from any source that produces an OX40R antibody. mRNA from OX40R antibody-producing cells may be isolated by standard techniques, cloned and/or amplified using PCR and library construction techniques, and screened using standard

protocols to obtain nucleic acid molecules encoding an amino acid sequence of an OX40P antibody. The mRNA may be used to produce cDNA for use in the polymerase chain reaction (PCR) or cDNA cloning of antibody genes. In one embodiment, the nucleic acid molecule is obtained from a hybridoma that expresses an OX40P antibody, as described above, preferably a hybridoma that has as one of its fusion partners a non-human transgenic animal cell that expresses human immunoglobulin genes. In another embodiment, the hybridoma is derived from a non-human, non-transgenic animal.

**[0086]** A nucleic acid molecule encoding the heavy chain of an OX40P antibody may be constructed by fusing a nucleic acid molecule encoding the heavy variable region with a nucleic acid molecule encoding a constant region of a heavy chain. Similarly, a nucleic acid molecule encoding the light chain of an OX40P antibody may be constructed by fusing a nucleic acid molecule encoding the light chain variable region with a nucleic acid molecule encoding a constant region of a light chain. The nucleic acid molecules encoding the VH and VL chain may be converted to full-length antibody genes by inserting them into expression vectors already encoding heavy chain constant and light chain constant regions, respectively, such that the VH segment is operatively linked to the heavy chain constant region (CH) segment(s) within the vector and the VL segment is operatively linked to the light chain constant region (CL) segment within the vector. Alternatively, the nucleic acid molecules encoding the VH or VL chains are converted into full-length antibody genes by linking, e.g., ligating, the nucleic acid molecule encoding a VH chain to a nucleic acid molecule encoding a CH chain using standard molecular biological techniques. The same may be achieved using nucleic acid molecules encoding VL and CL chains. The sequences of human heavy and light chain constant region genes are known in the art. See, e.g., Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., NIH Publ. No. 91-3242, 1991. Nucleic acid molecules encoding the full-length heavy and/or light chains may then be expressed from a cell into which they have been introduced and the OX40P antibody isolated.

**[0087]** The nucleic acid molecules may be used to recombinantly express large quantities of OX40P antibodies, as described below. The nucleic acid molecules may also be used to produce other binding molecules provided by the

disclosure, such as chimeric antibodies, single chain antibodies, immunoadhesins, diabodies, mutated antibodies, and antibody derivatives, as described elsewhere herein. In one embodiment, a nucleic acid molecule is used as probe or PCR primer for specific antibody sequences. For instance, a nucleic acid molecule probe may be used in diagnostic methods or a nucleic acid molecule PCR primer may be used to amplify regions of DNA that could be used, inter alia, to isolate nucleic acid sequences for use in producing variable regions of the OX40P antibodies.

**[0088]** Once DNA molecules encoding the $V_H$ and $V_L$ segments of an OX40P antibody are obtained, these DNA molecules can be further manipulated by recombinant DNA techniques, for example to convert the variable region genes to full-length antibody chain genes, to Fab fragment genes, or to a scFv gene. In these manipulations, a $V_L$- or $V_H$-encoding DNA molecule is operatively linked to another DNA molecule encoding another polypeptide, such as an antibody constant region or a flexible linker. The term "operatively linked," as used in this context, means that the two DNA molecules are joined such that the amino acid sequences encoded by the two DNA molecules remain in-frame.

**[0089]** The isolated DNA molecule encoding the $V_H$ region can be converted to a full-length heavy chain gene by operatively linking the $V_H$-encoding DNA molecule to another DNA molecule encoding heavy chain constant regions (CH1, CH2 and CH3). The sequences of human heavy chain constant region genes are known in the art (see, e.g., Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The heavy chain constant region can be an IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM or IgD constant region, but most preferably is an IgG1 or IgG2 constant region. The IgG1 constant region sequence can be any of the various alleles or allotypes known to occur among different individuals, such as Gm(1), Gm(2), Gm(3), and Gm(17). These allotypes represent naturally occurring amino acid substitutions in the IgG1 constant regions. For a Fab fragment heavy chain gene, the $V_H$-encoding DNA can be operatively linked to another DNA molecule encoding only the heavy chain CH1 constant region.

The CH1 heavy chain constant region may be derived from any of the heavy chain genes.

**[0090]** The isolated DNA molecule encoding the $V_L$ region can be converted to a full-length light chain gene (as well as a Fab light chain gene) by operatively linking the $V_L$-encoding DNA molecule to another DNA molecule encoding the light chain constant region, $C_L$. The sequences of human light chain constant region genes are known in the art (see e.g., Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The light chain constant region can be a kappa or lambda constant region. The kappa constant region may be any of the various alleles known to occur among different individuals, such as Inv(1), Inv(2), and Inv(3). The lambda constant region may be derived from any of the three lambda genes.

**[0091]** To create a scFv gene, the $V_H$- and $V_L$-encoding DNA fragments are operatively linked to another fragment encoding a flexible linker, e.g., encoding the amino acid sequence $(Gly_4\text{-}Ser)_3$, such that the $V_H$ and $V_L$ sequences can be expressed as a contiguous single-chain protein, with the $V_L$ and $V_H$ regions joined by the flexible linker (See e.g., Bird et al., (1988) Science 242:423-426; Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554). The single chain antibody may be monovalent, if only a single $V_H$ and $V_L$ are used, bivalent, if two $V_H$ and $V_L$ are used, or polyvalent, if more than two $V_H$ and $V_L$ are used. Bispecific or polyvalent antibodies may be generated that bind specifically to OX40R and to another molecule.

**[0092]** In another aspect, the present disclosure provides a vector, which comprises a nucleic acid molecule described herein above. The nucleic acid molecule may encode a portion of a light chain or heavy chain (such as a CDR or a variable region), a full-length light or heavy chain, polypeptide that comprises a portion or full-length of a heavy or light chain, or an amino acid sequence of an antibody derivative or antigen–binding fragment. To express a binding molecule, a DNA molecule encoding partial or full-length binding molecule is inserted into an expression vector such that the DNA molecule is operatively linked to transcriptional

and translational control sequences. In this context, the term "operatively linked" is intended to mean that the DNA molecule is ligated into a vector such that transcriptional and translational control sequences within the vector serve their intended function of regulating the transcription and translation of the DNA molecule. The expression vector and expression control sequences are chosen to be compatible with the expression host cell used. Expression vectors include, for example, plasmids, retroviruses, adenoviruses, adeno-associated viruses (AAV), plant viruses such as cauliflower mosaic virus, tobacco mosaic virus, cosmids, YACs, and EBV derived episomes. The DNA molecule encoding an amino acid sequence of the light chain and DNA molecule encoding an amino acid sequence of the heavy chain can be inserted into separate vectors or in the same vector. The DNA molecule is inserted into the expression vector by any suitable methods (e.g., ligation of complementary restriction sites on the antibody gene fragment and vector, or blunt end ligation if no restriction sites are present).

**[0093]** An example of a suitable expression vector is one that encodes a functionally complete human $C_H$ or $C_L$ immunoglobulin sequence, with appropriate restriction sites engineered so that any $V_H$ or $V_L$ sequence can be inserted and expressed. The expression vector also can encode a signal peptide that facilitates secretion of the amino acid sequence of the antibody chain from a host cell. The DNA encoding the amino acid sequence of an antibody chain may be cloned into the vector such that the signal peptide is linked in-frame to the amino terminus of the amino acid sequence of the antibody chain. The signal peptide can be an immunoglobulin signal peptide or a heterologous signal peptide (i.e., a signal peptide from a non-immunoglobulin protein).

**[0094]** In addition to the nucleic acid sequence encoding an amino acid sequence of an OX40R antibody (antibody chain genes), the expression vectors carry regulatory sequences that control the expression of the antibody chain genes in a host cell. The design of the expression vector, including the selection of regulatory sequences, may depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, and so forth. Regulatory sequences for mammalian host cell expression include viral elements that direct high levels of protein expression in mammalian cells, such as promoters and/or enhancers

derived from retroviral LTRs, cytomegalovirus (CMV) (such as the CMV promoter/enhancer), Simian Virus 40 (SV40) (such as the SV40 promoter/enhancer), adenovirus, (e.g., the adenovirus major late promoter (AdMLP)), polyoma and strong mammalian promoters such as native immunoglobulin and actin promoters. For further description of viral regulatory elements, and sequences thereof, see e.g., U.S. Patent Nos. 5,168,062, 4,510,245, and 4,968,615.

**[0095]** In addition to the antibody chain nucleic acid sequences and regulatory sequences, the recombinant expression vectors may carry additional sequences, such as sequences that regulate replication of the vector in host cells and selectable marker genes. The selectable marker gene facilitates selection of host cells into which the vector has been introduced (see e.g., U.S. Patent Nos. 4,399,216, 4,634,665 and 5,179,017). Selectable marker genes include the dihydrofolate reductase (DHFR) gene (for use in dhfr-host cells with methotrexate selection/amplification), the neomycin phosphotransferase gene (for G418 selection), and the glutamate synthetase gene. The design of the expression vector, including the selection of regulatory sequences, may depend on a number of factors, such as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, and so forth. Nucleic acid molecules encoding binding molecules and vectors comprising these nucleic acid molecules can be used for transformation of a suitable host cell for recombinant production of a binding molecule. A suitable host cell is transformed with one or more expression vectors carrying nucleic acid molecules encoding an amino acid sequence of a binding molecule such that the amino acid sequence is expressed in the host cell and, typically, secreted into the medium in which the host cell is cultured and from which medium the amino acid sequence can be recovered. Transformation of host cells can be by carried out by any suitable method know in the art, such as those disclosed in U.S. Patent Nos. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461, and 4,959,455.

**[0096]** The host cell may be a mammalian, insect, plant, bacterial, or yeast cell. Examples of mammalian cell lines suitable as host cells include Chinese hamster ovary (CHO) cells, NSO cells, SP2 cells, HEK-293T cells, NIH-3T3 cells, HeLa cells, baby hamster kidney (BHK) cells, African green monkey kidney cells (COS), human hepatocellular carcinoma cells (e.g., Hep G2), A549 cells, and a

number of other cell lines. Examples of insect cell lines include Sf9 or Sf21 cells. Examples of plant host cells include Nicotiana, Arabidopsis, duckweed, corn, wheat, potato, and so forth. Bacterial host cells include E. coli and Streptomyces species. Examples of yeast host cells include Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces cerevisiae, and Pichia pastoris.

**[0097]** Amino acid sequences of a binding molecule expressed by different cell lines or in transgenic animals may have different glycosylation. However, all binding molecules encoded by the nucleic acid molecules provided herein, or comprising the amino acid sequences provided herein are part of the present invention, regardless of the glycosylation of the binding molecules.

**[0098]** In another aspect, the present disclosure provides a method for producing an OX40P antibody or antigen-binding fragment thereof using phage display. The method comprises (a) synthesizing a library of human antibodies on phage, (b) screening the library with the OX40P or a portion thereof, (c) isolating phage that binds the OX40P or a portion thereof, and (d) obtaining the antibody from the phage. One exemplary method for preparing the library of antibodies comprises the step of: (a) immunizing a non-human animal comprising human immunoglobulin loci with OX40P or an antigenic portion thereof to create an immune response; (b) extracting antibody-producing cells from the immunized animal; (c) isolating RNA encoding heavy and light chains of the OX40P antibodies from the extracted cells; (d) reverse transcribing the RNA to produce cDNA; (e), amplifying the cDNA; and (f) inserting the cDNA into a phage display vector such that antibodies are expressed on the phage. Recombinant human OX40P antibodies or antigen binding fragments thereof can be isolated by screening a recombinant combinatorial antibody library. The library may be a scFv phage display library, generated using human $V_L$ and $V_H$ cDNAs prepared from mRNA isolated from B cells. Methods for preparing and screening such libraries are known in the art. Kits for generating phage display libraries are commercially available (e.g., the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catalog no. 27-9400-01; and the Stratagene SurfZAP™ phage display kit, catalog no. 240612).

**[0099]** In one case, to isolate and produce human OX40R antibodies with the desired characteristics, a human OX40R antibody as described herein is first used to select human heavy and light chain sequences having similar binding activity

36

toward OX40R using methods known in the art, such as the the epitope imprinting methods described in WO 93/06213. The antibody libraries used in this method may be scFv libraries prepared and screened as described in WO 92/01047, McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); and Griffiths et al., EMBO J. 12:725-734 (1993). The scFv antibody libraries may be screened using human CCR2 as the antigen.

**[0100]** Once initial human $V_L$ and $V_H$ regions are selected, "mix and match" experiments are performed, in which different pairs of the initially selected $V_L$ and $V_H$ segments are screened for OX40R binding to select $V_L/V_H$ pair combinations. Additionally, to further improve the quality of the antibody, the $V_L$ and $V_H$ segments of the $V_L/V_H$ pair(s) can be randomly mutated, within the CDR3 region of $V_H$ and/or $V_L$, in a process analogous to the *in vivo* somatic mutation process responsible for affinity maturation of antibodies during a natural immune response. This *in vitro* affinity maturation can be accomplished by amplifying $V_H$ and $V_L$ domains using PCR primers complimentary to the $V_H$ CDR3 or $V_L$ CDR3, respectively, which primers have been "spiked" with a random mixture of the four nucleotide bases at certain positions such that the resultant PCR products encode $V_H$ and $V_L$ segments into which random mutations have been introduced into the $V_H$ and/or $V_L$ CDR3 regions. These randomly mutated $V_H$ and $V_L$ segments can be re-screened for binding to OX40R.

**[0101]** Following screening and isolation of an OX40R antibody or antigen binding portion from a recombinant immunoglobulin display library, nucleic acids encoding the selected binding molecule can be recovered from the display package (e.g., from the phage genome) and subcloned into other expression vectors by recombinant DNA techniques. If desired, the nucleic acid can further be manipulated to create other antibody forms, as described below. To express a recombinant human antibody isolated by screening of a combinatorial library, the DNA encoding the antibody is cloned into a recombinant expression vector and introduced into mammalian host cells, as described above.

**[0102]** PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

**[0103]** In another aspect, the present disclosure provides a composition, e.g., a pharmaceutical composition, containing one or a combination of binding

37

molecules provided by the disclosure, and optionally a pharmaceutically acceptable carrier. The compositions can be prepared by conventional methods known in the art.

**[0104]** In some embodiments, the composition comprises an OX40R antibody or an antigen-binding fragment thereof. In a particular embodiment, the composition comprises antibody 11D4 or antibody 18D8, or a antigen-binding fragment of either antibody. In still other embodiments, the composition comprises a derivative of antibody 11D4 or antibody 18D8.

**[0105]** The term "pharmaceutically acceptable carrier" refers to any inactive substance that is suitable for use in a formulation for the delivery of a binding molecule. A carrier may be an antiadherent, binder, coating, disintegrant, filler or diluent, preservative (such as antioxidant, antibacterial, or antifungal agent), sweetener, absorption delaying agent, wetting agent, emulsifying agent, buffer, and the like. Examples of suitable pharmaceutically acceptable carriers include water, ethanol, polyols (such as glycerol, propylene glycol, polyethylene glycol, and the like) dextrose, vegetable oils ( such as olive oil), saline, buffer, buffered saline, and isotonic agents such as sugars, polyalcohols, sorbitol, and sodium chloride.

**[0106]** The compositions may be in any suitable forms, such as liquid, semi-solid, and solid dosage forms. Examples of liquid dosage forms include solution (e.g., injectable and infusible solutions), microemulsion, liposome, dispersion, or suspension. Examples of solid dosage forms include tablet, pill, capsule, microcapsule, and powder. A particular form of the composition suitable for delivering a binding molecule is a sterile liquid, such as a solution, suspension, or dispersion, for injection or infusion. Sterile solutions can be prepared by incorporating the antibody in the required amount in an appropriate carrier, followed by sterilization microfiltration. Generally, dispersions are prepared by incorporating the antibody into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium and other carriers. In the case of sterile powders for the preparation of sterile liquid, methods of preparation include vacuum drying and freeze-drying (lyophilization) to yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof. The various dosage forms of the compositions can be prepared by conventional techniques known in the art.

[0107] The relative amount of a binding molecule included in the composition will vary depending upon a number of factors, such as the specific binding molecule and carriers used, dosage form, and desired release and pharmacodynamic characteristics. The amount of a binding molecule in a single dosage form will generally be that amount which produces a therapeutic effect, but may also be a lesser amount. Generally, this amount will range from about 0.01 percent to about 99 percent, from about 0.1 percent to about 70 percent, or from about 1 percent to about 30 percent relative to the total weight of the dosage form.

[0108] In addition to the binding molecule, one or more additional therapeutic agents may be included in the composition. Examples of the additional therapeutic agents are described herein below. The suitable amount of the additional therapeutic agent to be included in the composition can be readily selected by a person skilled in the art, and will vary depending on a number of factors, such as the particular agent and carriers used, dosage form, and desired release and pharmacodynamic characteristics. The amount of the additional therapeutic agent included in a single dosage form will generally be that amount of the agent which produces a therapeutic effect, but may be a lesser amount as well.

[0109] USE OF THE BINDING MOLECULES AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

[0110] Binding molecules and pharmaceutical compositions comprising a binding molecule provided by the present disclosure are useful for therapeutic, diagnostic, or other purposes, such as enhancing an immune response, treating cancer, enhancing efficacy of other cancer therapy, or enhancing vaccine efficacy, and have a number of utilities, such as for use as medicaments or diagnostic agents. Thus, in another aspect, the present disclosure provides methods of using the binding molecules or pharmaceutical compositions.

[0111] In one particular aspect, methods are provided for enhancing immune response in a mammal, comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of a binding molecule provided by the disclosure. In some embodiments, the binding molecule is an OX40L antibody or antigen-binding fragment thereof and the mammal is a human. In a further embodiment, the binding

molecule is antibody 11D4 or antibody 18D8, or an antigen-binding fragment of either antibody. The term "enhancing immune response" or its grammatical variations, means stimulating, evoking, increasing, improving, or augmenting any response of a mammal's immune system. The immune response may be a cellular response (i.e. cell-mediated, such as cytotoxic T lymphocyte mediated) or a humoral response (i.e. antibody mediated response), and may be a primary or secondary immune response. Examples of enhancement of immune response include increased CD4+ helper T cell activity and generation of cytolytic T cells. The enhancement of immune response can be assessed using a number of *in vitro* or *in vivo* measurements known to those skilled in the art, including, but not limited to, cytotoxic T lymphocyte assays, release of cytokines (for example IL-2 production), regression of tumors, survival of tumor bearing animals, antibody production, immune cell proliferation, expression of cell surface markers, and cytotoxicity. Typically, methods of the disclosure enhance the immune response by a mammal when compared to the immune response by an untreated mammal or an animal not treated using the claimed methods. In one embodiment, the method enhances a cellular immune response, particularly a cytotoxic T cell response. In another embodiment, the cellular immune response is a T helper cell response. In still another embodiment, the immune response is a cytokine production, particularly IL-2 production.

**[0112]** In another particular aspect, the present disclosure provides a method of treating cancer in a mammal, comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of a binding molecule provided by the disclosure. The term "treating cancer" or "treatment of cancer" refers to causing a desirable or beneficial effect in a mammal diagnosed with a cancer. The desirable or beneficial effect may include inhibition of further growth or spread of cancer cells, death of cancer cells, inhibition of reoccurrence of cancer, reduction of pain associated with the cancer, or improved survival of the animal. Inhibition of reoccurrence of cancer contemplates cancer sites and surrounding tissue which have previously been treated by radiation, chemotherapy, surgery, or other techniques. The effect can be either subjective or objective. For example, if the animal is human, the human may note improved vigor or vitality or decreased pain as subjective symptoms of improvement or response to therapy. Alternatively, the clinician may notice a decrease in tumor size or tumor burden based on physical exam, laboratory parameters, tumor markers or

radiographic findings. Some laboratory signs that the clinician may observe for response to treatment include normalization of tests, such as white blood cell count, red blood cell count, platelet count, erythrocyte sedimentation rate, and various enzyme levels. Additionally, the clinician may observe a decrease in a detectable tumor marker. Alternatively, other tests can be used to evaluate objective improvement, such as sonograms, nuclear magnetic resonance testing and positron emissions testing. In some embodiments, the binding molecule is an OX40R antibody or an antigen-binding fragment thereof provided by the disclosure. In a further embodiment the binding molecule is antibody 11D4 or 18D8, or an antigen-binding fragment of either antibody. In a further embodiment, the mammal is a human.

**[0113]** In another particular aspect, the present disclosure provides a method of preventing cancer in a mammal, comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of a binding molecule provided by the disclosure. The term "preventing cancer" or "prevention of cancer" refers to delaying, inhibiting, or preventing the onset of a cancer in a mammal in which the onset of oncogenesis or tumorigenesis is not evidenced but a predisposition for cancer is identified whether determined by genetic screening, for example, or otherwise. The term also encompasses treating a mammal having premalignant conditions to stop the progression of, or cause regression of, the premalignant conditions towards malignancy. Examples of premalignant conditions include hyperplasia, dysplasia, and metaplasia. In some embodiments, the binding molecule is an OX40R antibody or a fragment thereof provided by the disclosure. In a further embodiment the binding molecule is antibody 11D4 or 18D8, or an antigen-binding fragment of either antibody. In a further embodiment, the mammal is a human.

**[0114]** A variety of cancers, whether malignant or benign and whether primary or secondary, may be treated or prevented with a method provided by the disclosure. Examples of such cancers include lung cancers such as bronchogenic carcinoma (e.g., squamous cell carcinoma, small cell carcinoma, large cell carcinoma, and adenocarcinoma), alveolar cell carcinoma, bronchial adenoma, chondromatous hamartoma (noncancerous), and sarcoma (cancerous); heart cancer such as myxoma, fibromas, and rhabdomyomas; bone cancers such as osteochondromas, condromas, chondroblastomas, chondromyxoid fibromas, osteoid osteomas, giant cell tumors,

chondrosarcoma, multiple myeloma, osteosarcoma, fibrosarcomas, malignant fibrous histiocytomas, Ewing's tumor (Ewing's sarcoma), and reticulum cell sarcoma; brain cancer such as gliomas (e.g., glioblastoma multiforme), anaplastic astrocytomas, astrocytomas, oligodendrogliomas, medulloblastomas, chordoma, Schwannomas, ependymomas, meningiomas, pituitary adenoma, pinealoma, osteomas, hemangioblastomas, craniopharyngiomas, chordomas, germinomas, teratomas, dermoid cysts, and angiomas; cancers in digestive system such as leiomyoma, epidermoid carcinoma, adenocarcinoma, leiomyosarcoma, stomach adenocarcinomas, intestinal lipomas, intestinal neurofibromas, intestinal fibromas, polyps in large intestine, and colorectal cancers; liver cancers such as hepatocellular adenomas, hemangioma, hepatocellular carcinoma, fibrolamellar carcinoma, cholangiocarcinoma, hepatoblastoma, and angiosarcoma; kidney cancers such as kidney adenocarcinoma, renal cell carcinoma, hypernephroma, and transitional cell carcinoma of the renal pelvis; bladder cancers; hematological cancers such as acute lymphocytic (lymphoblastic) leukemia, acute myeloid (myelocytic, myelogenous, myeloblastic, myelomonocytic) leukemia, chronic lymphocytic leukemia (e.g., Sezary syndrome and hairy cell leukemia), chronic myelocytic (myeloid, myelogenous, granulocytic) leukemia, Hodgkin's lymphoma, non-Hodgkin's lymphoma, B cell lymphoma, mycosis fungoides, and myeloproliferative disorders (including myeloproliferative disorders such as polycythemia vera, myelofibrosis, thrombocythemia, and chronic myelocytic leukemia); skin cancers such as basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, melanoma, Kaposi's sarcoma, and Paget's disease; head and neck cancers; eye-related cancers such as retinoblastoma and intraocular melanocarcinoma; male reproductive system cancers such as benign prostatic hyperplasia, prostate cancer, and testicular cancers (e.g., seminoma, teratoma, embryonal carcinoma, and choriocarcinoma); breast cancer; female reproductive system cancers such as uterine cancer (endometrial carcinoma), cervical cancer (cervical carcinoma), cancer of the ovaries (ovarian carcinoma), vulvar carcinoma, vaginal carcinoma, fallopian tube cancer, and hydatidiform mole; thyroid cancer (including papillary, follicular, anaplastic, or medullary cancer); pheochromocytomas (adrenal gland); noncancerous growths of the parathyroid glands; pancreatic cancers; and hematological cancers such as leukemias, myelomas, non-Hodgekin's lymphomas, and Hodgekin's lymphomas.

42

**[0115]** In practicing the therapeutic methods, the binding molecules may be administered alone as monotherapy, or administered in combination with one or more additional therapeutic agents or therapies. Thus, in another aspect, the present disclosure provides a combination therapy, which comprises a binding molecule provided by the disclosure in combination with one or more additional therapies or therapeutic agents. The term "additional therapy" refers to a therapy which does not employ a binding molecule provided by the disclosure as a therapeutic agent. The term "additional therapeutic agent" refers to any therapeutic agent other than a binding molecule provided by the disclosure. In some embodiments, the binding molecule is antibody 11D4 or 18D8, or an antigen-binding fragment of either antibody. In one particular aspect, the present disclosure provides a combination therapy for treating cancer in a mammal, which comprises administering to the mammal a therapeutically effective amount of a binding molecule provided by the disclosure in combination with one or more additional therapeutic agents. In a further embodiment, the mammal is a human.

**[0116]** A wide variety of cancer therapeutic agents may be used in combination with a binding molecule. One of ordinary skill in the art will recognize the presence and development of other cancer therapies which can be used in combination with the methods and binding molecules of the present disclosure, and will not be restricted to those forms of therapy set forth herein. Examples of categories of additional therapeutic agents that may be used in the combination therapy for treating cancer include (1) chemotherapeutic agents, (2) immunotherapeutic agents, and (3) hormone therapeutic agents.

**[0117]** The term "chemotherapeutic agent" refers to a chemical or biological substance that can cause death of cancer cells, or interfere with growth, division, repair, and/or function of cancer cells. Examples of chemotherapeutic agents include those that are disclosed in WO 2006/088639, WO 2006/129163, and US 20060153808, the disclosures of which are incorporated herein by reference. Examples of particular chemotherapeutic agents include: (1) alkylating agents, such as chlorambucil (LEUKERAN), cyclophosphamide (CYTOXAN), ifosfamide (IFEX), mechlorethamine hydrochloride (MUSTARGEN), thiotepa (THIOPLEX), streptozotocin (ZANOSAR), carmustine (BICNU, GLIADEL WAFER), lomustine

(CEENU), and dacarbazine (DTIC-DOME); (2) alkaloids or plant vinca alkaloids, including cytotoxic antibiotics, such as doxorubicin (ADRIAMYCIN), epirubicin (ELLENCE, PHARMORUBICIN), daunorubicin (CERUBIDINE, DAUNOXOME), nemorubicin, idarubicin (IDAMYCIN PFS, ZAVEDOS), mitoxantrone (DHAD, NOVANTRONE), dactinomycin (actinomycin D, COSMEGEN), plicamycin (MITHRACIN), mitomycin (MUTAMYCIN), and bleomycin (BLENOXANE), vinorelbine tartrate (NAVELBINE)), vinblastine (VELBAN), vincristine (ONCOVIN), and vindesine (ELDISINE); (3) antimetabolites, such as capecitabine (XELODA), cytarabine (CYTOSAR-U), fludarabine (FLUDARA), gemcitabine (GEMZAR), hydroxyurea (HYDREA), methotrexate (FOLEX, MEXATE, TREXALL), nelarabine (ARRANON), trimetrexate (NEUTREXIN), and pemetrexed (ALIMTA); (4) Pyrimidine antagonists, such as 5-fluorouracil (5-FU); capecitabine (XELODA), raltitrexed (TOMUDEX), tegafur-uracil (UFTORAL), and gemcitabine (GEMZAR); (5) taxanes, such as docetaxel (TAXOTERE), paclitaxel (TAXOL); (6) platinum drugs, such as cisplatin (PLATINOL) and carboplatin (PARAPLATIN), and oxaliplatin (ELOXATIN); (7) topoisomerase inhibitors, such as irinotecan (CAMPTOSAR), topotecan (HYCAMTIN), etoposide (ETOPOPHOS, VEPESSID, TOPOSAR), and teniposide (VUMON); (8) epipodophyllotoxins (podophyllotoxin derivatives), such as etoposide (ETOPOPHOS, VEPESSID, TOPOSAR); (9) folic acid derivatives, such as leucovorin (WELLCOVORIN); (10) nitrosoureas, such as carmustine (BiCNU), lomustine (CeeNU); (11) inhibitors of receptor tyrosine kinase, including epidermal growth factor receptor (EGFR), vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin receptor, insulin-like growth factor receptor (IGFR), hepatocyte growth factor receptor (HGFR), and platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), such as gefitinib (IRESSA), erlotinib (TARCEVA), bortezomib (VELCADE), imatinib mesylate (GLEEVEC), genefitinib, lapatinib, sorafenib, thalidomide, sunitinib (SUTENT), axitinib, rituximab, trastuzumab (HERCEPTIN), cetuximab (ERBITUX), bevacizumab (AVASTIN), and ranibizumab (LUCENTIS), lym-1 (ONCOLYM), antibodies to insulin-like growth factor -1 receptor (IGF-1R) that are disclosed in WO2002/053596); (12) angiogenesis inhibitors, such as bevacizumab (AVASTIN), suramin (GERMANIN), angiostatin, SU5416, thalidomide, and matrix metalloproteinase inhibitors (such as batimastat and

marimastat), and those that are disclosed in WO2002055106; and (13) proteasome inhibitors, such as bortezomib (VELCADE).

**[0118]** The term "immunotherapeutic agents" refers to a chemical or biological substance that can enhance an immune response of a mammal. Examples of immunotherapeutic agents include: bacillus Calmette-Guerin (BCG); cytokines such as interferons; vaccines such as MyVax personalized immunotherapy, Onyvax-P, Oncophage, GRNVAC1, FavId, Provenge, GVAX, Lovaxin C, BiovaxID, GMXX, and NeuVax; and antibodies such as alemtuzumab (CAMPATH), bevacizumab (AVASTIN), cetuximab (ERBITUX), gemtuzumab ozogamicin (MYLOTARG), ibritumomab tiuxetan (ZEVALIN), panitumumab (VECTIBIX), rituximab (RITUXAN, MABTHERA), trastuzumab (HERCEPTIN), tositumomab (BEXXAR), tremelimumab, CAT-3888, and agonist antibodies to CD40 receptor that are disclosed in WO2003/040170.

**[0119]** The term "hormone therapeutic agent" refers to a chemical or biological substance that inhibits or eliminates the production of a hormone, or inhibits or counteracts the effect of a hormone on the growth and/or survival of cancerous cells. Examples of such agents suitable for the methods herein include those that are disclosed in US20070117809. Examples of particular hormone therapeutic agents include tamoxifen (NOLVADEX), toremifene (Fareston), fulvestrant (FASLODEX), anastrozole (ARIMIDEX), exemestane (AROMASIN), letrozole (FEMARA), megestrol acetate (MEGACE), goserelin (ZOLADEX), and leuprolide (LUPRON). The binding molecules of this disclosure may also be used in combination with non-drug hormone therapies such as (1) surgical methods that remove all or part of the organs or glands which participate in the production of the hormone, such as the ovaries, the testicles, the adrenal gland, and the pituitary gland, and (2) radiation treatment, in which the organs or glands of the patient are subjected to radiation in an amount sufficient to inhibit or eliminate the production of the targeted hormone.

**[0120]** The combination therapy for treating cancer also encompasses the combination of a binding molecule provided by the disclosure with surgery to remove a tumor. The binding molecule may be administered to the mammal before, during, or after the surgery.

[0121] The combination therapy for treating cancer also encompasses combination of a binding molecule provided by the disclosure with radiation therapy, such as ionizing (electromagnetic) radiotherapy (e.g., X-rays or gamma rays) and particle beam radiation therapy (e.g., high linear energy radiation). The source of radiation can be external or internal to the mammal. The binding molecule may be administered to the mammal before, during, or after the radiation therapy.

[0122] ADMINISTRATION OF THE BINDING MOLECULES AND COMPOSITIONS

[0123] The binding molecules and compositions provided by the present disclosure can be administered via any suitable enteral route or parenteral route of administration. The term "enteral route" of administration refers to the administration via any part of the gastrointestinal tract. Examples of enteral routes include oral, mucosal, buccal, and rectal route, or intragastric route. "Parenteral route" of administration refers to a route of administration other than enteral route. Examples of parenteral routes of administration include intravenous, intramuscular, intradermal, intraperitoneal, intratumor, intravesical, intraarterial, intrathecal, intracapsular, intraorbital, intracardiac, transtracheal, intraarticular, subcapsular, subarachnoid, intraspinal, epidural and intrasternal, subcutaneous, or topical administration. The antibodies and compositions of the disclosure can be administered using any suitable method, such as by oral ingestion, nasogastric tube, gastrectomy tube, injection, infusion, implantable infusion pump, and osmotic pump. The suitable route and method of administration may vary depending on a number of factors such as the specific antibody being used, the rate of absorption desired, specific formulation or dosage form used, type or severity of the disorder being treated, the specific site of action, and conditions of the patient, and can be readily selected by a person skilled in the art

[0124] The term "therapeutically effective amount" of a binding molecule refers to an amount that is effective for an intended therapeutic purpose. For example, in the context of enhancing an immune response, a "therapeutically effective amount" is any amount that is effective in stimulating, evoking, increasing, improving, or augmenting any response of a mammal's immune system. In the context of treating cancer, a "therapeutically effective amount" is any amount that is sufficient

to cause any desirable or beneficial effect in the mammal being treated, such as inhibition of further growth or spread of cancer cells, death of cancer cells, inhibition of reoccurrence of cancer, reduction of pain associated with the cancer, or improved survival of the mammal. In a method of preventing cancer, a "therapeutically effective amount" is any amount that is effective in delaying, inhibiting, or preventing the onset of a cancer in the mammal to which the binding molecule is administered. The therapeutically effective amount of a binding molecule usually ranges from about 0.001 to about 500 mg/kg , and more usually about 0.05 to about 100 mg/kg, of the body weight of the mammal. For example, the amount can be about 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 50 mg/kg, or 100 mg/kg of body weight of the mammal. In some embodiments, the therapeutically effective amount of an OX40R antibody is in the range of about 0.1 – 30 mg/kg of body weight of the mammal. The precise dosage level to be administered can be readily determined by a person skilled in the art and will depend on a number of factors, such as the type, and severity of the disorder to be treated, the particular binding molecule employed, the route of administration, the time of administration, the duration of the treatment, the particular additional therapy employed, the age, sex, weight, condition, general health and prior medical history of the patient being treated, and like factors well known in the medical arts.

**[0125]** A binding molecule or composition is usually administered on multiple occasions. Intervals between single doses can be, for example, weekly, monthly, every three months or yearly. An exemplary treatment regimen entails administration once per week, once every two weeks, once every three weeks, once every four weeks, once a month, once every 3 months or once every three to 6 months. Typical dosage regimens for an OX40R antibody include 1 mg/kg body weight or 3 mg/kg body weight via intravenous administration, using one of the following dosing schedules: (i) every four weeks for six dosages, then every three months; (ii) every three weeks; (iii) 3 mg/kg body weight once followed by 1 mg/kg body weight every three weeks.

## EXAMPLES

### EXAMPLE 1: PREPARATION OF OX40R ANTIBODIES

**[0126]** Illustrative antibodies in accordance with the disclosure were prepared, selected, and assayed as follows:

**[0127]** Immunization with the OX40R Antigen and Selection of Mice Producing OX40R Monoclonal Antibodies:

**[0128]** Fully human monoclonal antibodies to human OX40R were prepared using human Ig transgenic mouse strains HCo7, HCo12, Hco17, and Hco27 as well as the human transchromosomal/transgenic strain, KM (Medarex, Inc.). These strains all express fully human antibodies that are indistinguishable from antibodies isolated from humans.

**[0129]** In the transgenic strains, both the endogenous mouse kappa light chain gene and the endogenous mouse heavy chain gene were homozygously disrupted as described in Chen et al. (1993) EMBO J. 12:821-830 and in Example 1 of WO 01/09187, respectively. Moreover, they carry a human kappa light chain transgene, KCo5, as described in Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851. In contrast, the transgenic strains are distinct with respect to their human heavy chain genes. The HCo7 strain carries the HCo7 human heavy chain transgene as described in U.S. Patent Nos.: 5,545,806, 5,625,825, and 5,545,807; the HCo12 strain carries the HCo12 human heavy chain transgene as described in Example 2 of WO 01/09187; the Hco17 strain carries the Hco17 human heavy chain transgene as described in Example 8 of Deshpande et al., US 2005/0191293A1; the Hco27 strain carries the Hco27 human heavy chain transgene as described in Example 5 of PCT/US2008/072640 filed 08 August 2008. The KM strain carries a human mini-chromosome as described in Ishida et al., (2002), Cloning and Stem Cells, 4: 91-102.

**[0130]** General immunization schemes for HuMab mice are described in Lonberg et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851; and PCT Publication WO 98/24884.

**[0131]** HuMab mice of the HCo7, HCo12, Hco17, Hco27 and KM strains were immunized beginning at 6-16 weeks of age with 15-25 µgs of purified

48

human recombinant OX40R-Ig protein and murine pre-B cell line, 300-19 (Reth, M. G. et al., Nature 312 29: 418-42, 1984; Alt, F. et al., Cell 27: 381-390, 1981), transfected to express human OX40R in Ribi adjuvant. The purified human recombinant OX40R-Ig protein is a construct of the extracellular domain (amino acids 1-220) of human OX40R fused to the constant region of human IgG1. Administration was via injection intra-peritoneally, subcutaneously or into the footpad at 3-28 day intervals, up to a total of 10 immunizations. Immune response was monitored via ELISA and FACS screening as described below.

**[0132]** Selection of HuMab Mice Producing OX40R Antibodies:

**[0133]** To select HuMab mice producing antibodies that bind to the OX40R, blood from the immunized mice was obtained and analyzed by ELISA for specific binding to purified human OX40R recombinant protein, and by FACS for binding to a cell line expressing full length human OX40R, and not to a control cell line not expressing OX40R.

**[0134]** ELISA binding assay was as described by Fishwild et al. (1996), Nature Biotechnology 14: 845-851. Briefly, microtiter plates were coated using 50 µl/well of a purified recombinant OX40R-Ig solution containing 1 µg /ml in PBS, and incubated overnight at 4°C. The wells were then blocked using 200 µl/well of 5% chicken serum in PBS/Tween (0.05%). Dilutions of plasma from OX40R-immunized mice were added to each well and incubated for 1 hour at ambient temperature. The plates were washed with PBS/Tween and then incubated with a goat-anti-human IgG Fc polyclonal antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for 1 hour at room temperature. After washing, the plates were developed with ABTS substrate (Moss Inc., product #: ABTS-1000 mg/ml) and analyzed by spectrophotometer at OD 405.

**[0135]** FACS assay was carried out according to conventional procedures. Briefly, OX40R-expressing 300-19 cells were incubated with serum from immunized mice diluted at 1:20. Cells were washed and specific antibody binding was detected with FITC-labeled anti-human IgG Ab. Flow cytometric analyses were performed on a FACS flow cytometry instrument (Becton Dickinson, San Jose, CA).

[0136] Mice that developed the highest titers of OX40R antibodies were used for fusions. Fusions were performed as described below and hybridoma supernatants were tested for anti-OX40R activity by ELISA and FACS.

[0137] Generation of Hybridomas Producing Human Monoclonal Antibodies to OX40R:

[0138] The mice selected above were boosted intravenously with OX40R-Ig at 3 days and then again at 2 days prior to sacrifice and removal of the spleen and/or lymph nodes.

[0139] The splenocytes and/or lymph node lymphocytes isolated from the immunized HuMab or KM mice were fused to SP2/0 non-secreting mouse myeloma cells (ATCC, CRL-1581) using electrofusion (E-fusion, Cyto Pulse™ technology, Cyto Pulse™ Sciences, Inc., Glen Burnie, MD), according to standard or manufacturer-recommended protocols. Briefly, single cell suspensions of splenocytes and/or lymph node lymphocytes from immunized mice were prepared and then combined with an equal number of SP2/0 non-secreting mouse myeloma cells; E-fusion was then performed.

[0140] The cells were then plated at $2x10^4$ cells/well in flat bottom microtiter plate, and incubated for 10-14 days in selective medium containing 10% fetal bovine serum, 10% P388D1 (ATCC, CRL-TIB-63) conditioned medium, 3-5% (IGEN) in DMEM (Mediatech, Herndon, VA, Cat. No. CRL 10013, with high glucose, L-glutamine and sodium pyruvate), 7 mM HEPES, 0.055 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 IU/mL penicillin – 0.1 mg/mL streptomycin, and 1x HAT (Sigma, Cat. No. CRL -P-7185).

[0141] After 1-2 weeks, cells were cultured in medium in which the HAT was replaced with HT. Approximately 10-14 days after cell plating, supernatants from individual wells were screened for the presence of human gamma, kappa antibodies. The supernatants which scored positive for human gamma, kappa were then screened by ELISA and FACS (using the protocol described above) for human OX40R monoclonal IgG antibodies. The antibody-secreting hybridomas were transferred to 24 well plates, screened again and, if confirmed positive for human OX40R IgG monoclonal antibodies, were subcloned at least twice by limiting

dilution. The stable subclones were then cultured in vitro to generate small amounts of antibody in tissue culture medium for further characterization.

## EXAMPLE 2: BIOLOGIGAL/PHARMACOLOGICAL EXAMPLES

**[0142]** A. *In vitro* Study Procedures:

**[0143]** Binding to the Extracellular Domain of the OX40R: A human OX40-Ig fusion protein was diluted in BupH™ Carbonate buffer, pH 9.4 (Pierce, Rockford, IL) was coated onto 96-well Maxisorb plates (Nunc, Roskilde, Denmark) at 100 µl/ well (0.25 µg/ml) and incubated overnight at 4°C. The Plates were washed three times with wash buffer containing 0.05% Tween 20 (Sigma, St Louis, MO) diluted in PBS (Sigma, St Louis, MO) and blocked with 300 µl/well of 0.5% BSA (Sigma, St Louis, MO) in PBS for 1 hour at RT°. Next, the plates were washed and incubated with anti-human OX40 reactive antibodies diluted in blocking buffer at various concentrations (100 µl/well) and incubated for 1 hour at RT°. The plates were then washed and incubated for one hour at RT° with a horse radish peroxidase labeled anti-human kappa chain antibody (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) at 25 ng/ml in blocking buffer. Finally, the assay plates were washed and 100 µl/well of 1-Step Turbo-TMB substrate (Pierce, Rockford, IL) was added for 30 minutes at RT°. The reaction was stopped by adding an equal volume of 2M $H_2SO_4$ and absorbance was read at 450 nm on a Molecular Devices Spectra Max 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

**[0144]** FACS Based Binding to Cell Surface OX40R: OX40R-expressing cell lines (see below) or activated primary peripheral blood mononuclear cells (see below) were used to assess binding on both the human and cynomolgus OX40 receptors. Cells were harvested and washed ($5 \times 10^5$/tube) using wash buffer at RT°. The wash buffer consisted of PBS, 2% heat-inactivated fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT) and 0.02% sodium azide (Sigma, St. Louis, MO). Next, 100 µl of various concentrations of antibody was added to the cells (starting at 30 ug/ml and using a 3-fold titration) diluted in wash buffer containing 0.005 mg/ml of cytocholasin B (Sigma, St. Louis, MO). The cells were gently rocked at RT° for 3 hours. Next, the cells were washed twice and resuspended in 0.5 ml/tube with cold wash buffer and

10,000 events were collected and analyzed using a Becton Dickinson FACSCalibur and CellQuest software (San Jose, CA).

**[0145]** Biacore Assay: The Biosensor biospecific interaction analysis instrument (BIAcore 2000) uses surface plasmon resonance to measure molecular interactions on a CM5 sensor chip. Changes in the refractive indices between two media, glass and carboxymethylated dextran, caused by the interaction of molecules to the dextran side of the sensor chip, is measured and reported as changes in arbitrary reflectance units (RU) as detailed in the manufacturer's application notes.

**[0146]** The carboxymethylated dextran surfaces on a CM5 sensor chip were activated by derivatization with 0.05 M N-hydroxysuccinimide mediated by 0.2 M N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide for 7 min. Streptavidin (Sigma S-4762) at a concentration of 500 µg/ml, in 10mM Na acetate, pH 4.5, was injected onto three surfaces (Flow Cell-2, 3 and 4) at a rate of 5 µl/min and covalently immobilized to the flow cell surfaces with approximately 2500RU's. 35 µl of 10mM Na acetate buffer was injected over Flow cell-1 during immobilization in place of antigen to make an activated blank surface to measure non-specific binding. Deactivation of unreacted N-hydroxysuccinimide esters on all four Flow cells was performed using 1M ethanolamine hydrochloride, pH 8.5. Following immobilization, the flow cells are cleaned of any unreacted or poorly bound material with 5 regeneration injections of 5 µl of 50 mM NaOH until a stable baseline was achieved.

**[0147]** Biotinylated CD134-mulg (Ancell 513-030), at a concentration of 10 µg/ml at a flow rate of 5 µl/min was manually injected over Flow cells-2, 3 and 4 to achieve 3 surface densities: Fc-2=150RU, Fc-3=375RU and Fc-4=580RU. The different density surfaces were prepared to monitor the possibility of mass transport limited binding during association phase and rebinding during dissociation, both artifacts that are influenced by surface density that must be avoided.

**[0148]** A dilution series of the OX40L antibodies were prepared over a concentration range of 666 nM to 66 pM by half logs in running buffer (0.01M HEPES, pH 7.4, 0.15M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% polysorbate 20 (v/v)). The flow rate was set at 5 µl/min and 25 µl of each concentration point sample was injected over the sensor chip with a regeneration injection of 5 µl of 50 mM NaOH between

52

each concentration of antibody injected. Dissociation time was 5 min. The data was analyzed using BIAevaluation 3.0 global fit software (separate analysis of each concentration point).

**[0149]** Epitope Characterization: 300-19 cells expressing a recombinant human OX40-CD40 fusion construct corresponding to 1-235 amino acid sequence of OX40 (extracellular and transmembrane domain) and 216-278 amino acid sequence of CD40 (intracellular domain) was used for antibody epitope analysis. The OX40-CD40 expressing cell line was grown in FPMI medium (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone, Logan, UT), 10 mM hepes, 1% penicillin-streptomycin, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids and 0.05 mM 2-mercapthoethanol (Gibco, Grand Island, NY). 300-19.hCD134.2 cells ($5x10^5$/tube) were washed once in 3 mls of cold wash buffer (PBS, 2% FBS and 0.02% sodium azide). The cell supernatant was aspirated and 100 µl of wash buffer containing 300 µg/ml of primary unconjugated OX40 reactive antibody was added to the cell pellet, mixed and incubated for 30 minutes at 4°C. Next, a fluorochrome labeled secondary antibody was added to the tube, mixed and incubated for an additional 30 minutes at 4°C. The OX40 reactive flourochrome labeled antibodies included either 10 µl of phycoerythrin (PE) labeled Ber Act 35 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA.), PE-labeled L106 (BD Pharmingen, San Jose, CA) or Alexa Fluor 647 conjugated OX40R antibody. The OX40R antibody was labeled with fluorochome using the Alex Fluor 647 protein labeling kit as described by the manufacturer (Molecular Probes, Eugene, OR). After staining, cells were then washed 3 times with wash buffer, resuspended in cold wash buffer and 10,000 events were collected and analyzed using a Becton Dickinson FACSCalibur and CellQuest software (San Jose, CA). Antibodies were demeaned as binding to the same epitope when the primary antibody blocked the staining of the secondary fluorochrome labeled antibody by more than 80%.

**[0150]** Antibody OX40 Ligand-OX40R Inhibition Assay: Antibodies were tested for their ability to block the binding of the 300-19 human-OX40 ligand (L) expressing cells to OX40-human IgG1 fusion protein coated plates. The 300-19-OX40L cell line was grown in FPMI medium (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT), 10 mM HEPES,

S3

1% penicillin-streptomycin, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids, 0.05 mM 2-mercapthoethanol and 0.5 mg/ml Geneticin (Gibco, Grand Island, NY). The OX40-human IgG1 fusion protein contains the first 220 amino acids of the extracellular OX40 protein. The fusion protein was coated onto to Nunc Maxisorb plates (Nunc, Roskilde, Denmark) in 100 µl/well (5 µg/ml) in coating buffer (BupH, Carbonate-Bicarbonate buffer, Pierce, Rockford, IL) and incubated overnight at 4°C. Next, plates were blotted on a paper towel to remove fluid, blocked with 200 µl/well with blocking buffer (5% Carnation Milk diluted in PBS) and incubated at RT° for two hours. Plates were washed with PBS and various dilutions of antibody diluted in PBS were then added (50 µl/well) to the assay plate and incubated at RT° for 30 minutes. Next, 50 µl/well of cells in PBS at $6x10^5$/well were added to the antibody containing wells and incubated for an additional 60 minutes at 37 °C in a 5% $CO_2$ humidified chamber. The plates were gently washed 2 times with PBS to remove non-adherent cells and cell activity in the wells was measured by adding 200 µl of a 20 ug/ml Fluorescein Diacetate (Sigma, St. Louis, MO) PBS solution to each well. The plates were incubated at 37 °C in a 5% $CO_2$ humidified chamber for 90 minutes and read using a spectrophotometer at 490 (Spectra Max 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

**[0151]** OX40P Antibody Selectivity Assay (ELISA): Maxisorb 96-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with 100 µl of human TNFα receptor family member fusion proteins at 0.25 µg/ml diluted in BupH™ Carbonate buffer, pH 9.4 (Pierce, Rockford, IL) and incubated overnight at 4°C. The selectivity receptor fusion proteins tested included CD40-Ig (Alexis Biochemicals, San Diego, CA), CD137-Ig (R&D Systems, Minneapolis, MN) and CD271-Ig (Alexis Biochemicals, San Diego, CA). Also included as the positive control with each assay was the OX40-Ig fusion protein (in-house construct, Bioexpress, 97/2117). Plates were then washed three times with wash buffer containing 0.05% Tween 20 (Sigma, St Louis, MO) diluted in PBS and blocked with 300 µl of 0.5% BSA (Sigma, St Louis, MO) in PBS (Sigma, St Louis, MO) for 1 hour at RT°. Next, the plates were washed and 100 µl/well of anti-human OX40 reactive antibodies were added to the plates at various concentrations and incubated for 1 hour at RT°. Plates were thoroughly washed three times and OX40P antibody binding was detected with a horse radish peroxidase

54

labeled anti-human kappa chain antibody (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) at 25 ng/ml for 1 hour at RT°. Plates were then washed three times which was followed by the addition of 100 µl/well of 1-Step Turbo-TMB substrate (Pierce, Rockford, IL) for 30 minutes at RT°. The reaction was stopped by adding an equal volume of 2M $H_2SO_4$. Absorbance was read at 450 nm on a Molecular Devices Spectra Max 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

**[0152]** Species Cross-reactivity: Cell Lines Expressing OX40R: The 300-19 cell line expressing either a recombinant human OX40-CD40 fusion construct corresponding to 1-235 of OX40R (extracellular and transmembrane domain) and 216-278 of CD40 (intracellular domain) or the entire cynomolgus OX40R protein.

**[0153]** Preparation of Human T Lymphocytes: Human whole blood was collected into heparinized syringes (Baxter; Deerfield, IL) and then immediately transferred to Sigma Accuspin tubes (Sigma, St. Louis, MO) for the isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) as described by the manufacturer. The PBMC were washed twice with DPBS and T lymphocytes were isolated using a T cell purification column as described by the manufacturer (R & D Systems, Minneapolis, MN). Briefly, PBMCs were resuspended in 2 mls of column buffer and loaded into a pre-washed T cell isolation column. PBMCs were incubated for 10 minutes at room temperature and T cells were eluted with column buffer, washed one time and resuspended TCM at $2x10^6$/ml consisting of RPMI 1640 (Sigma, St Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT) and L-glutamine (2 mM), Hepes (10 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (50 ug/ml) (Gibco, Grand Island, NY.). A 2 ml volume of T cells containing an anti-human CD28 antibody at 1 ug/ml (clone 37407, R & D Systems, Minneapolis, MN) was added to the wells of a 24 well plate pre-coated with an anti-human CD3 antibody clone UCTH1 (R & D Systems, Minneapolis, MN) at 5 µg/ml in PBS. T cell cultures were stimulated for 3 days prior to being tested for human OX40 cross-reactivity by flow cytometry.

**[0154]** Preparation of Cynomolgus PBMCs: Cynomolgus whole blood was obtained using heparinized vacutainer tubes (BD; Franklin Lakes, NJ) and was diluted 1:4 in PBS. Diluted whole blood was mixed and 15 mls was carefully layered over an equal volume of Histopaque 1077 (Sigma, St Louis, MO). The tubes were spun at 1000 x g for 45 minutes at RT° and the mononuclear PBMC interface was

harvested, washed once in PBS and resuspended for 2 minutes at RT° with ACK lysing buffer (Biosource, Rockville, MD) to remove any RBCs. After a PBS wash, the PBMCs were counted and readjusted to $1x10^6$/ml in tissue culture medium (TCM). TCM consisted of RPMI 1640 (Sigma, St Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT) and L-glutamine (2 mM), Hepes (10 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (50 ug/ml) purchased from Gibco (Grand Island, NY). Next, 2 mls of the PBMC preparation containing an anti-human CD28 cross-reactive antibody (clone CD28.2, BD Biosciences, San Diego, CA) was added to the wells of a 24 well plate (Costar, Corning, NY) pre-coated with an anti-monkey CD3 antibody (clone FN18, Biosource, Camarillo, CA) at 10 µg/ml in PBS. PBMC cultures were stimulated for 4 days prior to being tested for human OX40 cross-reactivity by flow cytometry.

**[0155]** Preparation of Rabbit PBMCs: Rabbit whole blood was drawn into heparinized vacutainer tubes (BD; Franklin Lakes, NJ) and immediately diluted 1:3 with warm HBSS (Gibco, Grand Island, NY). After mixing, 5 mls of the diluted blood was carefully layered over and equal volume of Lympholyte-Rabbit (Cedarlane Laboratories, Westbury, NY) and centrifuged for 30 minutes at 25 °C. The PBMC interface was collected, washed twice with PBS and resuspended to $2x10^6$/ml in TCM containing PHA at 10 ng/ml (Remel, Lenexa, KS). The cells were cultured for 24-48 hours.

**[0156]** Preparation of Canine PBMCs: Canine whole blood was collected using heparinized vacutainer tubes (BD; Franklin Lakes, NJ). Next, the blood was mixed with an equal volume of warm HBSS (Gibco, Grand Island, NY). Four mls of diluted blood was slowly layered over 3 mls of Lympholyte-M (Cedarlane Laboratories, Westbury, NY) in a 15 ml conical tubes. The tubes were centrifuged for 20 minutes at 800 x g and the PBMC interface was collected, washed twice with HBSS and resuspended in TCM at $2 \times 10^6$/ml. PBMCs were added to the wells of a 24 well plate (2 ml/well) and the cells were stimulated with 2 µg/ml of ConA (Sigma, St. Louis, MO) for 48 hours.

**[0157]** Preparation of Murine and Rat PBMCs: Rat whole blood collected in heparinized syringes was diluted 1:3 in warm HBSS. Next, 5 mls was carefully layered over an equal volume of Lympholyte-Rat (Cedarlane Laboratories,

56

Westbury, NY). The tubes were centrifuged for 20 minutes at 1500 RPM. The PBMCs interface was collected, washed twice and the cell pellet was re-adjusted to $2x10^6$/ml in TCM. Two mls of cells were added to each well of a 24 well plate and stimulated for 24-48 hours with PHA (Remel, Lenexa, KS) at 10 ng/ml prior to flow cytometry staining.

**[0158]** Flow Cytometry Staining for Species Cross-reactivity: Stimulated mouse, rat, rabbit, dog and cynomolgus PBMCs and the 300-19 cell line expressing the cynomolgus OX40 receptor were used to test for human OX40 antibody species cross-reactivity. Human OX40 expressing activated T lymphocytes and OX40 transduced 300-19 cells were used as positive controls. Cells ($5.0x10^5$/tube) were washed once in cold wash buffer (PBS, 2% FBS and 0.02% sodium azide) and 100 µl/tube of Alexa Fluor 647 conjugated control or OX40 reactive antibodies at 5 ug/ml was added to each tube. The antibodies were labeled using an Alex Fluor 647 protein labeling kit as described by the manufacturer (Molecular Probes, Eugene, OR). The cells were incubated in the dark with fluorochrome antibodies on ice for 30 minutes, washed three times and resuspended in 0.5 ml wash buffer for analysis. Antibody staining was measured and analyzed using a Becton Dickinson FACSCalibur and CellQuest software (San Jose, CA).

**[0159]** Luciferase Activity Assay: 293T cells containing the extracellular domain of OX40 and the intracellular domain of CD40 fused to a NFkB reporter containing luciferase were prepared. Cells were harvested, washed and resuspended into phenol red free complete medium (DMEM containing 10% fetal bovine serum, HEPES buffer, nonessential amino acids and L-glutamine) at density of $0.5 X 10^6$ cell/ml. 30 ul of cells were plated into each assay well of a 96 well plate (PerkinElmer, parts number 6005680). Test antibodies were added to each well alone or in the presence of a cross linking antibody Fab' goat anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). The plate was incubated overnight at 37C. 100 ul of luciferase (Promega, Bright-glo luciferasay system, Cat. # E2620) was added the next day and the amount of luciferase activity was measured using a syntillation counter (TopCount, Packard –NXT).

**[0160]** Human αCD3 IL-2 Assay: Human whole blood was collected in heparinized (Baxter; Deerfield, IL) syringes, layered over Accuspin tubes (Sigma; St.

Louis, MO) and centrifuged for 15 minutes at 2000 rpm's. The buffy coat was collected, washed with PBS (Sigma, St. Louis, MO), and red blood cells lysed with water. T cells were separated out by human $CD3^+$ enrichment columns (R&D; Minneapolis, MN), counted and adjusted to $1 \times 10^6$/ml in RPMI media (Gibco; Grand Island, NY) containing: 10% fetal calf serum (Hyclone; Logan, UT), 10 mM hepes, 1% penicillin-streptomycin, 2 mM L-glutamine and 0.1 mM non-essential amino acids (all Gibco). Concurrently, human anti-CD3ε clone #UCHT1 (R&D systems, Minneapolis, MN) was placed at 2.5 µgs/ml in PBS into 24 well plates (Costar; Corning, NY) and incubated for 2 hours at 37°C. The plates were washed 3x with PBS and the following added to the wells: T cells at $1 \times 10^6$/well, serial dilutions of OX40 antibodies (or $IgG_2$ KLH control) and $F(ab')_2$ goat anti-human IgG Fcγ to cross link: (added at 2.5 ug/mL). Supernatants were pulled at 48 and 72 hours and IL-2 levels were assessed by ELISA (R&D).

**[0161]** Cynomolgus αCD3 IL-2 Assay: Cynomolgus monkey whole blood was collected in heparinized tubes (BD; Franklin Lakes, NJ), diluted 1:4 in PBS, layered over Histopaque 1077 (Sigma, St Louis, MO) and centrifuged for 45 minutes at 2200 rpm's. The buffy coat was collected, washed with PBS, and red blood cells lysed with water. Cells were adjusted to $1 \times 10^6$/ml and added to 24 well plates that had been pre-coated for 2 hours with varying concentrations of monkey anti-CD3, clone FN-18 (Biosource; Camarillo, CA) at 37°C. Serial dilutions of OX40 antibody (or $IgG_1$ KLH control), as well as $F(ab')_2$ goat anti-human IgG Fcγ at 2.5 ug/mL were added to the wells. Supernatants were collected at 24 and 48 hours and IL-2 levels were assessed by ELISA (Biosource, Camarillo, CA ).

**[0162]** Alloantigen Primed T Cells Assay: Freshly isolated human T cells (see above) were incubated with mitomycin c treated allogeneic tumor cells (Raji) for 3-4 days. T cells were then harvested, washed, and rested for 1 day in fresh media prior to stimulating with 11D4. The level of IL-2 was assessed 24 hours latter by ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN).

**[0163]** B. *In vivo* Study Procedures

**[0164]** SCID-beige Human Tumor Models Using Mice Engrafted With Human T cells and Dendritic Cells: SCID –beige mice ( Taconic #CBSBG-MM)

58

were acclimated for 5-7 days after arrival prior to use. The following tumor cell lines were used: RAJI, ATCC #CCL-86; BT-474, ATCC #HTB-20; PC-3, ATCC#-1435; and LoVo, ATCC# CCL-229.

**[0165]** Purified T lymphocytes (T cells) and monocyte derived dendritic cells were prepared from human blood as follows: Human mononuclear cells were collected from heparinized blood using Sigma Accuspin Tubes #A7054. Cells were collected, placed in a T75 flask, and incubated for 3hrs at 37 °C in a humidified incubator under 5% $CO_2$. The non-adherent cells were collected and saved (see below). The flask containing the adherent cells was incubated with 20 ml RPMI complete medium (containing 10% fetal calf serum) supplemented with IL-4 (R&D) at 10 ng/ml and GM-CSF (R&D) at 100 ng/ml. The culture was then incubated for 6-7 days at $37^0$C in a humidified incubator under 5% $CO_2$. The non-adherent monocyte derived dendritic cells were then collected by decanting and rinsing flask several times with RPMI complete medium.

**[0166]** The initial non-adherent mononuclear cells were used to purify T cells via high affinity negative selection using T cell enrichment columns (R&D) as per manufacturer's instructions. Purified T cells are cryo-preserved in Recovery-Cell Culture Medium at $10^7$/ml and stored in liquid Nitrogen until use. Tumor cells ($1 \times 10^7$) were injected subcutaneously (SC) with T cells ($1 \times 10^6$) and monocyte-derived dendritic cells ($5 \times 10^5$) from the same donor, at 0.2 mL/mouse. Tumor growth was monitored over time with calipers.

**[0167]** C. Results for Antibody 11D4

**[0168]** (1) *In Vitro* Studies :

**[0169]** Certain properties of antibody11D4 from *in vitro* studies are summarized in Table 3.

**[0170]** *Antibody 11D4 binds to the OX40R with high affinity.*

**[0171]** This was demonstrated by using an IgG1 fusion protein containing the extracellular domain of the OX40R and on whole cells (OX40R+ transfected cells and activated primary T cells). In examples using the IgG1 fusion

protein, 11D4 bound to the extracellular domain of the OX40R with an $EC_{50}$ of 0.5 +/- 0.18 µg/mL (3.5 nM). This binding was confirmed on 300-19 pre-B cells expressing the full length extracellular domain of the OX40R (no binding was observed on parental 300-19 cells). The $EC_{50}$ for binding to OX40R transfected cells was 0.2 +/- 0.16 µg/mL (1.7 nM). In order to confirm that binding was observed on primary T cells, peripheral blood T cells were isolated from multiple human donors and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 for 2 days to upregulate the expression of the OX40R. Saturation binding data on these T cells indicated that 11D4 binds with an $EC_{50}$ of 0.6 +/-1.0 µg/mL (4.0 nM, N = 17 donors). These data demonstrate that 11D4 avidly binds to the OX40R.

**[0172]** In order to further characterize this binding, data was collected to assess the region on the extracellular domain of the OX40R where 11D4 interacts and to also determine whether the receptor was internalized following binding. Competition binding data to the OX40R IgG1 fusion protein indicated that 11D4 competes for binding with OX40 ligand expressing cells providing evidence that 11D4 interacts at the ligand binding region of the receptor. In addition, 11D4 does not cross-compete with two commercially available OX40R antibodies, BerAct35 and L106, for binding to T cells as assessed by FACS analysis. FACS analysis using non-competing detection antibodies indicated that the OX40R was not internalized following the pre-incubation of primary, activated T cells with 11D4 for 30 minutes. Its binding affinity, determined by Biacore analysis using the OX40R extracellular domain fusion protein as the immobilized ligand, indicated that the equilibrium dissociation constant (KD) of 11D4 for binding was 0.48 nM. These analyses also estimated the off rate constant (kd) of 11D4 to be 5.72 E-05 1/s. Therefore, 11D4 binds with high affinity to the ligand binding region of the OX40R, has a slow off-rate constant, and does not internalize the receptor following binding.

**[0173]** *Antibody 11D4 selectively binds to the OX40R .*

**[0174]** The selectivity of 11D4 for the OX40R was assessed against other members of the TNFR superfamily using data related to IgG1 fusion protein constructs containing the respective extracellular domain of the related receptor. These receptors included the CD40 receptor, 4-1BB receptor (CD137) and the nerve growth factor receptor (CD271). In all cases, no significant binding was observed at

60

concentrations up to 100 µg/mL (700 nM) on these receptors. When compared to binding observed to the OX40R fusion protein ($EC_{50}$ = 0.5 ug/ml), these data demonstrate that 11D4 is >100-fold selective for the OX40R vs other related family members tested. (See Figures 1a and 1b).

**[0175]** Functional Activity of Antibody 11D4:

**[0176]** The functional activity of 11D4 was demonstrated on both OX40R+ transfected cells and on primary T cells. In these assays, 11D4 demonstrated agonist activity when added to cells with or without a secondary antibody, $F(ab')_2$ goat anti-human IgG Fcγ.

**[0177]** In the first set of experiments, 11D4 was assessed for agonist activity using 293 cells transfected with the extracellular and transmembrane domain of the OX40R fused to the intracellular domain of CD40 with an NFkB luciferase reporter. In this assay, 11D4 enhanced signaling through the OX40R with a mean $EC_{50}$ of 0.33 µg/mL (2.2 nM, N = 4). A representative concentration-response curve for the induction of luciferase by 11D4 is shown in Figure 2. In the absence of the $F(ab')_2$ secondary antibody, the magnitude of luciferase activity was reduced 4-fold along with the $EC_{50}$.

**[0178]** As further evidence for the agonist activity of 11D4, antigen-specific T cells were generated. Freshly isolated human T cells were incubated with mitomycin c treated allogeneic tumor cells (Raji) for 3-4 days. T cells were then harvested, washed, and rested for 1 day in fresh media prior to stimulating with 11D4. FACS analysis indicated a high level of OX40R expression on these cells even after resting. 11D4 induced high levels of IL-2 by these cells, in some cases exceeding 100 ng/mL (Figure 3). The average $EC_{50}$ for this response from 2 separate examples was 0.008 +/- 0.006 µg/mL. In the absence of 11D4, only minimal levels of IL-2 were secreted by these cells.

**[0179]** 11D4 also enhances the IL-2 production by the primary human T cells stimulated by anti-CD3. Although the signal to noise ratio in this assay was low in some assays due to the induction of IL-2 by anti-CD3 alone, 11D4 enhanced IL-2 production when added with $F(ab')_2$ goat anti-human IgG Fcγ. No activity was

61

observed for 11D4 on freshly isolated T cells in the absence of anti-CD3. The magnitude of IL-2 augmentation by 11D4 ranged from 2.3 to 57-fold vs. anti-CD3 alone depending on the donor and the amount of IL-2 generated by anti-CD3. The effect of 11D4 on IL-2 production by primary human T cells stimulated with 2.5 µg/mL anti-CD3 is represented in Figure 4 (using an 8 point concentration curve with 1:3 dilutions). The average $EC_{50}$ calculated from those data which used 8-point concentration response curves was 0.042 +/- 0.01 µg/mL (see Table 4).

**[0180]** Functional activity of 11D4 on IL-2 production was also assayed using monkey cells stimulated with anti-CD3 and 11D4 (along with $F(ab')_2$ secondary antibody). Results are represented in Figure 5 and Table 5. These data indicated that the $EC_{50}$ for 11D4 was similar between monkey and human cells (0.022 vs 0.042 µg/mL for human cells), but the magnitude of IL-2 induced above that of anti-CD3 alone was significantly less using Cynomolgus T cells (approx. 35-fold, 5762 +/- 4748 pg/mL IL-2 for human cells (N = 21) vs 261 +/- 294 pg/mL IL-2 for monkey cells (N = 9).

**[0181]** Species Cross-Reactivity:

**[0182]** 11D4 was assessed for its ability to bind to T cells from multiple species. T cells were isolated from mouse, rat, rabbit, dog, and monkey and activated with either anti-CD3 plus anti-CD28 or mitogen. No binding was observed to mouse, rat, rabbit or dog cells as indicated by FACS analysis. The lack of binding to mouse OX40R was also confirmed by ELISA using a commercially available fusion protein containing the extracellular domain of the murine OX40R. In contrast, 11D4 binds to Cynomolgus monkey T cells as determined in a saturation binding assay by FACS. The range of $EC_{50}$ values obtained using different monkeys is shown in Figure 6. For comparison, the range of $EC_{50}$ values obtained using human cells is shown in Figure 7. Although variable, the range of $EC_{50}$ values was similar between monkey and human cells (mean values are 0.354 µg/mL for monkey vs 0.566 µg/mL for human cells).

**[0183]** (2) *In Vivo* Studies:

62

[0184] The lack of 11D4 cross-reactivity with the murine OX40R required the development of a xenogenic tumor model using Severe Combined Immunodeficient (SCID) beige mice. SCID-beige mice lack murine T and B lymphocytes and NK cells making them ideal recipients for the engraftment of human immune cells and the growth of human tumors. Four tumor cell lines representing diverse tumor types were tested in this *in vivo* model. None of the tumor lines expressed OX40R. In all cases, tumor cells ($1 \times 10^7$) were injected subcutaneously (SC) with T cells ($1 \times 10^6$) and monocyte derived dendritic cells ($5 \times 10^5$) from the same donor. 11D4 administered by intraperitoneal (IP) injection inhibited tumor growth up to 98% in these models as summarized in Table 6 . The IP route of administration was chosen for 11D4 due to its ease of administration and rapid dissemination into the peripheral blood.

[0185] Efficacy of 11D4 Against a B Cell Lymphoma in SCID-beige Mice:

[0186] SCID-beige mice were injected SC with the Burkitt's B cell lymphoma, Raji, together with human T cells and monocyte-derived dendritic cells. Mice received a single IP injection of either 11D4 or an isotype control antibody (IgG2 anti-KLH) at the time of tumor injection. As shown in Figure 8, 11D4 decreased the rate of tumor growth in treated animals. The tumor size in each individual animal (N = 10) on day 21 after challenge is shown in Figure 9, illustrating 64% inhibition in tumor growth by a dose level of 10 mg/kg. No activity was observed in the absence of T cells and dendritic cells.

[0187] Efficacy of 11D4 in a Prostate Tumor Model:

[0188] SCID-beige mice were injected SC with the prostate adenocarcinoma PC-3 together with human T cells and monocyte-derived dendritic cells. Mice received a single IP injection of either 11D4 or an isotype control antibody (IgG2 anti-KLH) at the time of tumor injection. The results, which are represented in Figure 10, show that 11D4 treatment resulted in a dose-dependent inhibition of tumor growth. The tumor size in each individual animal (N = 10) from this study on day 27 after challenge is shown in Figure 11, illustrating a 70% inhibition in tumor growth when animals were administered a single injection of 1.0

63

mg/kg 11D4, and 90% inhibition at a dose of 10 mg/kg. The plasma levels of 11D4 determined on day 27 in these animals were 6.2 µg/mL at the 1.0 mg/kg dose level.

**[0189]** Efficacy of 11D4 in a Colon Carcinoma Tumor Model:

**[0190]** SCID-beige mice were injected SC with the colorectal adenocarcinoma LoVo together with human T lymphocytes and autologous monocyte-derived dendritic cells. Mice received a single IP injection of either 11D4 or a control antibody (IgG2 anti-KLH) at the time of tumor injection. The results, which are represented in Figure 12, show that 11D4 dose dependently decreased tumor growth in these animals. The tumor size in each individual animal (N = 10) from this study on day 27 after challenge is shown in Figure 13, illustrating a 64 % inhibition in tumor growth using a single dose of 1.0 mg/kg and a 87 % inhibition of tumor growth at a dose level of 10.0 mg/kg.

**[0191]** Efficacy of 11D4 in a Mammary Carcinoma Tumor Model

**[0192]** SCID-beige mice were injected SC with the mammary carcinoma BT474 together with human T lymphocytes and autologous monocyte-derived dendritic cells. Mice received two injections (IP) of either 11D4 or a control antibody (IgG2 anti-KLH) at the time of tumor injection and again 30 days latter. The results, which are represented in Figure 14, show that 11D4 decreased tumor growth in these animals. The tumor size in each individual animal (N = 10) from this study on day 85 after challenge is shown in Figure 15 illustrating a 98% inhibition in tumor growth at a dose level of 10.0 mg/kg and 85% inhibition at a dose of 1 mg/kg.

**[0193]** D. Results for Antibody 18D8

**[0194]** (1) *In Vitro* Studies :

**[0195]** Results from *in vitro* studies for antibody 18D8 are summarized in Table 7.

**[0196]** Effect of antibody 18D8 on anti-CD3 induced IL-2 production by primary human T cells from different donors are also shown in Table 8.

**[0197]** (2) *In Vivo* Studies :

[0198] Efficacy of 18D8 against B Cell Lymphoma in a SCID-beige Mice Model

[0199] SCID-beige mice were injected SC with the Burkitt's B cell lymphoma, Raji, together with human T lymphocytes and autologous monocyte-derived dendritic cells. Mice received a single IP injection of either 18D8 or an isotype control antibody (IgG2 anti-KLH) at the time of tumor injection. Ten animals per group were used in each study. The results from two studies are presented in Table 9. The results show that 18D8 produced significant anti-tumor efficacy at the doses of 1.0 mg/kg and 10 mg/kg. No activity was observed in the absence of T cells and dendritic cells, suggesting that this anti-tumor effect may be immune mediated.

[0200] Efficacy of 18D8 against Prostate Tumor in a SCID-beige Mice Model

[0201] SCID-beige mice were injected SC with the prostate adenocarcinoma PC-3 together with human T cells and autologous monocyte-derived dendritic cells. Mice received a single IP injection of either 18D8 or an isotype control antibody (IgG2 anti-KLH) at the time of tumor injection. Ten animals per group were used in the study. The results are presented in Table 9. The results show that 18D8 treatment resulted in a 42%, 90%, and 38% inhibition of tumor growth at the doses of 0.1 mg/kg, 1.0 mg/kg, and 10 mg/kg, respectively.

[0202] DEPOSIT INFORMATION

[0203] Applicants have deposited a culture of E.coli DHα5 containing plasmid that encodes the heavy chain of antibody 11D4 and a culture of E.coli DHα5 containing plasmid that encodes the light chain of antibody 11D4 in the American Type Culture collections (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, on July 10, 2007, which have been assigned deposit numbers PTA-8524 and PTA-8525, respectively. These deposits were made under the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder (Budapest Treaty). These deposits will be maintained without restriction in the ATCC depository for a period of 30 years, or 5 years after the most recent request, or for the effective life of the patent, whichever is longer, and will be replaced if the deposits

65

become non-viable during that period. Availability of the deposited materials is not to be construed as a license to practice the invention in contravention of the rights granted under the authority of any government in accordance with its patent laws.

**[0204]** All references cited in this specification, including, without limitation, all papers, publications, patents, patent applications, books, journal articles, are hereby incorporated by reference into this specification in their entireties. The discussion of the references herein is intended to merely summarize the assertions made by their authors and no admission is made that any reference constitutes prior art.

**[0205]** Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustrations and examples for purposes of clarity of understanding, it will be readily apparent to those of ordinary skill in the art in light of the teachings herein that certain changes and modifications may be made to the invention without departing from the spirit or scope of the appendant claims.

66

TABLE 1. Sequence Identifiers for Antibodies 11D4 and 18D8

| SEQ ID NO: | Antibody | Sequence |
|---|---|---|
| 1 | 11D4 | $V_H$ CDR1 Amino Acid |
| 2 | 11D4 | $V_H$ CDR2 Amino Acid |
| 3 | 11D4 | $V_H$ CDR3 Amino Acid |
| 4 | 11D4 | $V_L$ CDR1 Amino Acid |
| 5 | 11D4 | $V_L$ CDR2 Amino Acid |
| 6 | 11D4 | $V_L$ CDR3 Amino Acid |
| 7 | 11D4 | $V_H$ Amino Acid |
| 8 | 11D4 | $V_L$ Amino Acid |
| 9 | 11D4 | Heavy Chain Amino Acid |
| 10 | 11D4 | Light Chain Amino Acid |
| 11 | 11D4 | $V_H$ Nucleic Acid |
| 12 | 11D4 | $V_L$ Nucleic Acid |
| 13 | 18D8 | $V_H$ CDR1 Amino Acid |
| 14 | 18D8 | $V_H$ CDR2 Amino Acid |
| 15 | 18D8 | $V_H$ CDR3 Amino Acid |
| 16 | 18D8 | $V_L$ CDR1 Amino Acid |
| 17 | 18D8 | $V_L$ CDR2 Amino Acid |
| 18 | 18D8 | $V_L$ CDR3 Amino Acid |
| 19 | 18D8 | $V_H$ Amino Acid |
| 20 | 18D8 | $V_L$ Amino Acid |
| 21 | 18D8 | Heavy Chain Amino Acid |
| 22 | 18D8 | Light Chain Amino Acid |
| 23 | 18D8 | $V_H$ Nucleic Acid |
| 24 | 18D8 | $V_L$ Nucleic Acid |

67

TABLE 2A. Amino Acid Sequences for Antibody 11D4

| DESCRIPTION | SEQUENCE (Variable region in upper case, constant region in lower case, CDRs underlined) |
|---|---|
| Heavy Chian | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAP<br>GKGLEWVSYISSSSSTIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN<br>SLRDEDTAVYYCARESGWYLFDYWGQGTLVTVSSastkgpsvfpl<br>apcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssnfg<br>tqtytcnvdhkpsntkvdktverkcevecppcpappvagpsvflfppkpkdtlmisrtpevtc<br>vvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvvsvltvvhqdwlngkeykc<br>kvsnkglpapiektisktkgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesn<br>gqpennykttppmldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspg<br>k |
| Light Chain | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK<br>APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY<br>YCQQYNSYPPTFGGGTKVEIKrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfy<br>preakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglss<br>pvtksfnrgec |

68

TABLE 2B. Amino Acid Sequences for Antibody 18D8

| DESCRIPTION | SEQUENCE (Variable region in upper case, constant region in lower case, CDRs underlined) |
|---|---|
| Heavy Chain | EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAP GKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTALYYCAKDQGTADYYFYYGMDVWGQGTTVTVS Sastkgpsvfplapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglys lssvvtvpssnfgtqtytcnvdhkpsntkvdktverkcevecppcpappvagpsvflfppkpk dtlmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvvsvltvvh qdwlngkeykckvsnkglpapiektiskttgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgf ypsdiavewesngqpennykttppmldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealh nhytqkslslspgk |
| Light Chain | EIVVTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQQRSNWPTFGQGTKVEIKrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvclinnfypre akvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvt ksfnrgec |

69

TABLE 3. Summary of Certain *in vitro* Properties of Antibody 11D4

| Parameter | Activity µg/ml | (nM) |
|---|---|---|
| Affinity for OX40R: (Biacore) | | |
| $K_D$ | 0.07 | 0.48 |
| Off rate (kd) | | 5.7E-05 1 /s |
| Binding to OX40R: | | |
| Fusion protein extracellular domain | 0.5 +/- 0.18 | 3.50 |
| Saturation binding ($EC_{50}$): | | |
| CD3/CD28 stimulated T cells (N = 17) | 0.6 +/- 1.00 | 4.00 |
| OX40P+ 300-19 cells (N = 5) | 0.2 +/- 0.16 | 1.70 |
| *In vitro* stimulation of OX40P+ transfected cells (luciferase) ($EC_{50}$; N = 4) | 0.33 +/- 0.22 | 2.20 |
| Augmentation of T cell activity: | 0.042 +/- 0.01 | 0.30 |
| - CD3 induced IL-2 production (N = 12) | 0.008 +/- 0.006 | 0.04 |
| - Stimulation of IL-2 production by antigen-primed cells (N = 2) | | |
| Selectivity (binding) (CD40, CD137, CD271) | > 100 µg/mL | > 700.00 |

Values represent the mean +/- one SD

TABLE 4. Effect of Antibody 11D4 on Anti-CD3 Induced IL-2 Production by Primary Human T Cells

| $EC_{50}$ (μg/mL) | Max IL-2 (pg/mL) | ECmax (μg/mL) | Stimulation Index | Donor |
|---|---|---|---|---|
| 0.008 | 4831 | 0.05 | 3.8 | 1 |
| 0.011 | 5450 | 0.05 | 2.6 | 2 |
| 0.014 | 6571 | 0.5 | 2.3 | 3 |
| 0.014 | 7271 | 0.05 | 5.9 | 4 |
| 0.011 | 6313 | 0.05 | 9.1 | 5 |
| ND | ND | ND | 7.0 | 6 |
| 0.010 | 1006 | 0.05 | 4.8 | 7 |
| ND | ND | ND | 5.9 | 8 |
| ND | ND | ND | 25.4 | 9 |
| ND | ND | ND | 57.0 | 10 |
| ND | ND | ND | 8.3 | 11 |
| ND | ND | ND | 5.1 | 12 |
| ND | ND | ND | 2.7 | 13 |
| ND | ND | ND | 4.6 | 14 |
| 0.014 | 4687 | 0.05 | 6.0 | 15 |
| 0.014 | 3012 | 0.05 | 35.2 | 16 |
| ND | ND | ND | 21.4 | 17 |
| 0.029 | 2796 | 0.125 | 3.8 | 18 |
| 0.052 | 1718 | 0.125 | 5.5 | 19 |
| 0.020 | 14190 | 0.56 | 16.8 | 20 |
| 0.068 | 1611 | 1.67 | 7.9 | 21 |

Max IL-2: Amount of IL-2 produced with 11D4 at the ECmax over anti-CD3 alone

ECmax: Concentration of 11D4 producing the maximum level of IL-2 over anti-CD3 alone

Stimulation Index: Ratio of the maximum level of IL-2 produced with 11D4 vs the amount of IL-2 produced with anti-CD3 alone

71

ND = not determined.

Values for the last four donors (18-21) are from dose response curve done in 8-point 1:3 or 1:4 dilutions; all other values represent log dilution curves. The $EC_{50}$ from the 1:3 and 1:4 concentration curves was 0.042 +/- 0.01 ug/mL, N = 4.

TABLE 5. Effect of Antibody 11D4 on Anti-CD3 Induced IL-2 Production by Cynomolgus T Cells.

| $EC_{50}$ (µg/mL) | Max IL-2 Induced (pg/mL) | ECmax (µg/mL) | Stimulation index | Donor |
|---|---|---|---|---|
| 0.007 | 376 | 0.05 | 3.5x | 32750 |
| 0.002 | 116 | 0.05 | 2.2x | 2325 |
| ND | ND | ND | 2.0x | 32405 |
| 0.007 | 167 | 0.05 | 34.4 | 32081 |
| 0.011 | 978 | 0.005 | 5.6x | 32842 |
| ND | ND | ND | 6.3x | 2325 |
| 0.008 | 40 | 0.021 | 2.7x | 33081 |
| 0.031 | 168 | 0.062 | 5.0x | 33080 |
| 0.028 | 128 | 0.062 | 3.8x | 33062 |

Max IL-2: Amount of IL-2 produced with 11D4 at ECmax over anti-CD3 alone

ECmax: Concentration of 11D4 producing the maximum level of IL-2 over anti-CD3 alone

Stimulation Index: Ratio of the maximum IL-2 produced with 11D4 over the amount produced with anti-CD3 alone

ND = not determined

**[0206]** Values for the last three donors (33081,33080, and 33062) in Table 6 are from dose- response curve done in 8-point 1:3 dilutions. All other values represent log dilution curves. The $EC_{50}$ derived from those curves using 1:3 dilutions was 0.022 +/- 0.01; N = 3.

TABLE 6. Human Tumor Growth Inhibition by Antibody 11D4
In SCID-beige Mice Engrafted with Human T cells and Dendritic Cells

| Tumor Type | Dosing with 11D4 | Study Duration | 10 mg/kg | 1.0 mg/kg | 0.1 mg/kg | 0.01 mg/kg |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Raji: B cell lymphoma | Day 1 | 21 days | 64% | 42% | 27% | nd |
| Raji: B cell lymphoma | Day 1 | 21 days | nd | 75% | 42% | 8% |
| Lovo: colon carcinoma | Day 1 | 25 days | 76% | 44% | 20% | nd |
| Lovo: colon carcinoma | Day 1 | 25 days | 87% | 64% | 15% | nd |
| PC3: prostate | Day 1 | 27 days | 90% | 77% | 45% | nd |
| PC3: prostate | Day 1 | 27 days | 90% | 70% | 50% | nd |
| BT474: breast | Day 1 and 30 | 85 days | 96% | 85% | 46% | nd |

Values = % inhibition of tumor growth determined at study termination

**[0207]** nd = not detected

74

TABLE 7. Results of *in vitro* Studies with Antibody 18D8

| Parameter | Activity | |
|---|---|---|
| | µg/ml | (nM) |
| Affinity for OX40R (Biacore): | | |
| $K_D$ | 0.49 | 3.38 |
| Off rate (kd) | | 2.9E-04 1 /s |
| Binding to OX40R ($EC_{50}$): | | |
| -Fusion protein extracellular domain | 0.034 +/- 0.01 | 0.23 |
| -Saturation binding: | | |
| CD3/CD28 stimulated T cells (N = 4) | 1.06 +/- 0.51 | 7.30 |
| OX40R+ 300-19 cells (N=2) | 0.24 +/- 0.09 | 1.66 |
| Augmentation of T Cell Activity ($EC_{50}$): | | |
| - CD3 induced IL-2 production (N = 4) | 0.049 +/- 0.06 | 0.33 |
| - Stimulation of IL-2 production by antigen-primed cells (N = 1) | 0.014 +/- 0 | 0.10 |
| Selectivity (Binding to CD40, CD137, CD271): | > 100 µg/mL | > 700.00 |

Values for activity expressed in µg/ml represent the mean +/- one SD.

78

TABLE 8. Effect of Antibody 18D8 on Anti-CD3 Induced IL-2 Production by Primary Human T Cells.

| $EC_{50}$ (μg/mL) | Max IL-2 (pg/mL) | ECmax (μg/mL) | Stimulation Index | Donor |
|---|---|---|---|---|
| 0.013 | 1120 | 0.05 | 13.7 | LC |
| 0.024 | 4334 | 0.5 | 5.1 | TH |
| 0.024 | 2280 | 0.5 | 5.4 | KO |
| 0.135 | 1356 | 0.5 | 2.4 | RN |

Max IL-2: Amount of IL-2 produced with 18D8 at the ECmax over anti-CD3 alone.

ECmax: Concentration of 18D8 producing the maximum level of IL-2 over anti-CD3 alone.

Stimulation Index: Ratio of the maximum IL-2 produced with 18D8 over the amount produced with anti-CD3 alone.

Values represent log dilution curves.

TABLE 9. Inhibition of Human Tumor Growth by Antibody 18D8 in SCID-beige Mice

| Tumor Type | Dosing with 18D8 | Study Duration | Dose Level of 18D8 (mg/kg) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 10 | 1.0 | 0.1 | 0.01 |
| Raji: B cell lymphoma | Day 1 | 23 days | 73% | 73% | 11% | nd |
| Raji: B cell lymphoma | Day 1 | 24 days | 54% | 59% | nd | nd |
| PC3: prostate | Day 1 | 24 days | 88% | 90% | 42% | nd |

Values = % inhibition of tumor growth determined at study termination

nd = not determined

CLAIMS

We claim:

1. An isolated binding molecule that competes for binding to human OX40R with an antibody that comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7; and

(b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8.

2. An isolated binding molecule that binds to human OX40R, comprising:

(a) a heavy chain CDR1 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1;

(b) a heavy chain CDR2 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 2; and

(c) a heavy chain CDR3 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 3.

3. An isolated binding molecule that binds to human OX40R, comprsing:

(a) a light chain CDR1 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 4;

(b) a light chain CDR2 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 5; and

(c) a light chain CDR3 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 6.

4. An isolated binding molecule that binds to human OX40R, comprsing:

(a) a heavy chain CDR1 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1;

(b) a heavy chain CDR2 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 2;

(c) a heavy chain CDR3 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 3;

(d) a light chain CDR1 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 4;

(e) a light chain CDR2 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 5; and

(f) a light chain CDR3 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 6.

5. An isolated binding molecule that binds to human OX40R, comprsing:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7; and

(b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8.

6. An isolated binding molecule that binds to human OX40R, comprsing:

(a) a heavy chain CDR1 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 13;

(b) a heavy chain CDR2 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 14; and

(c) a heavy chain CDR3 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 15.

7. An isolated binding molecule that binds to human OX40R, comprsing:

(a) a light chain CDR1 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 16;

(b) a light chain CDR2 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 17; and

(c) a light chain CDR3 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 18.

8. An isolated binding molecule that binds to human OX40R, comprsing:

(a) a heavy chain CDR1 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 13;

(b) a heavy chain CDR2 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 14;

(c) a heavy chain CDR3 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 15;

79

(d) a light chain CDR1 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 16;

(e) a light chain CDR2 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 17; and

(f) a light chain CDR3 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 18.

9. An isolated binding molecule that binds to human OX40R, comprising:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 19; and

(b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20.

10. An isolated binding molecule according to any one of claims 1-9 that:

(a) binds to human OX40R with a $K_D$ of $1 \times 10^{-6}$ M or less; and

(b) has agonist activity on human OX40R.

11. The binding molecule according to any one of claims 1-9, which is a human antibody.

12. The binding molecule according to any one of claims 1-9, which is a chimeric or humanized antibody.

13. The antibody of claim 11, wherein the antibody binds to human OX40R with a $K_D$ of 100 nM or less.

14. An isolated human monoclonal antibody that binds to human OX40R, which comprises a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 or SEQ ID NO: 21.

15. An isolated human monoclonal antibody that binds to human OX40R, which comprises a light chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 or SEQ ID NO: 22.

16. An isolated human monoclonal antibody that binds to human OX40R, which comprises a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 and a light chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10.

17. An isolated human monoclonal antibody that binds to human OX40R, which comprises a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21 and a light chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 22.

18. A composition comprising a binding molecule according to any one of claims 1 - 17, and optionally a pharmaceutically acceptable carrier.

19. A method of treating cancer in a mammal in need thereof, comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of a binding molecule according to any one of claims 1 – 17.

20. The method according to claim 19, wherein the cancer is selected from the group of consisting of breast cancer, prostate cancer, colorectal cancer, lung cancer, or hematological cancer.

21. A method of preventing cancer in a mammal in need thereof, comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of a binding molecule according to any one of claims 1 – 17.

22. A method of enhancing an immune response in a mammal, comprising admnistering to the mammal a therapeutically effective amount of a binding molecule according to any one of claims 1 – 17.

23. The method according to any one of claims 19 - 22, wherein the binding molecule is a human antibody.

24. The method according to claim 23, wherein the binding molecule is the human antibody according to claim 16 or 17.

25. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence that encodes a binding molecule according to any one of claims 1 – 17.

26. The nucleic acid molecule according to claim 25, comprising a nucleotide sequence selected from SEQ ID Nos: 11, 12, 23, or 24.

27. A vector comprising the nucleic acid molecule of claim 25 or claim 26.

28. The vector according to claim 27, further comprising an expression control sequence operably linked to the nucleic acid molecule.

29. A host cell comprising the vector according to claim 27 or claim 28.

30. A method of inhibiting growth of tumor cells, comprising contacting the tumor cells with a binding molecule according to any one of claims 1-17 or with a composition comprising a binding molecule according to any one of claims 1-17, wherein the binding molecule is in an amount effective to inhibit the growth of the tumor cells.

Figure 1a.

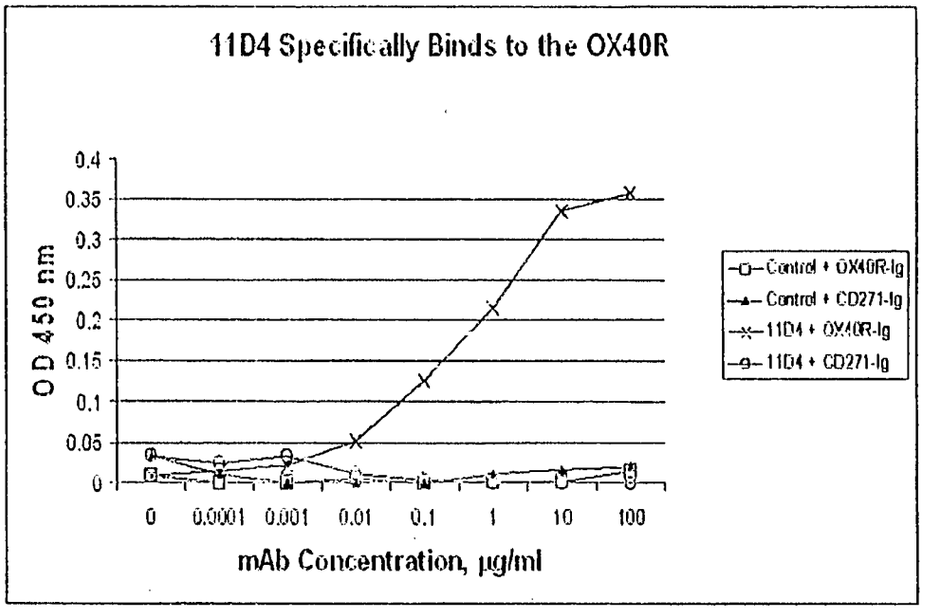



Figure 1b.

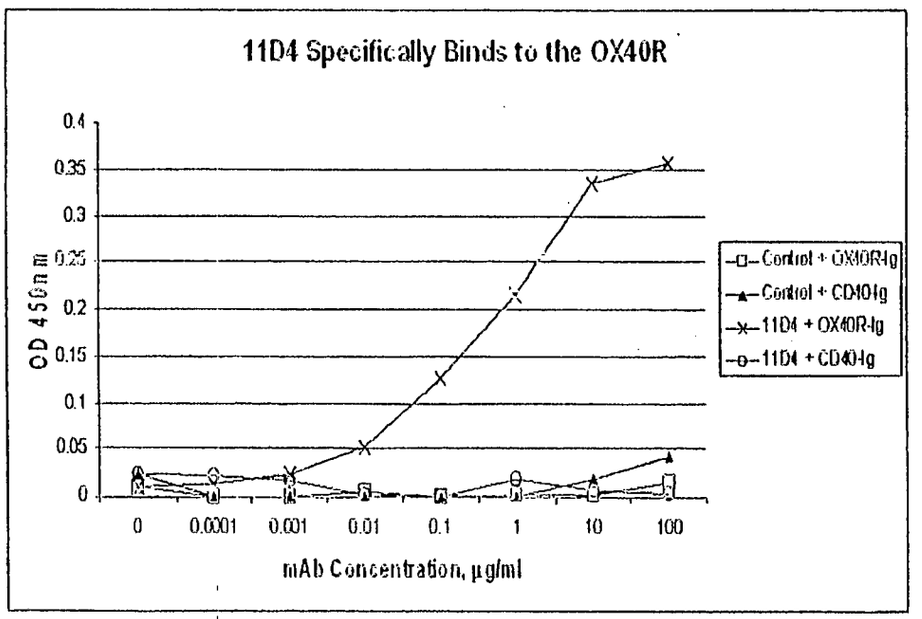


Figure 2.

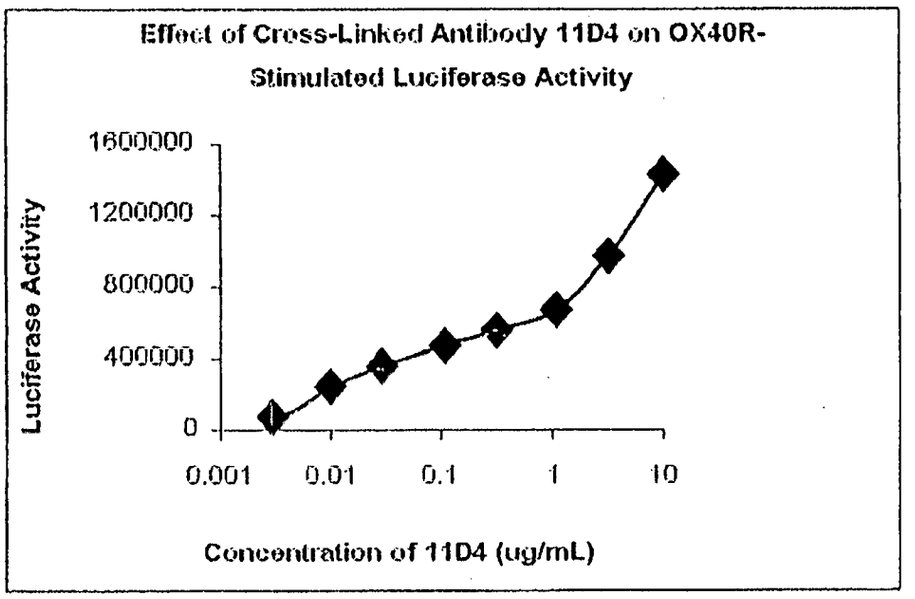



Figure 3.

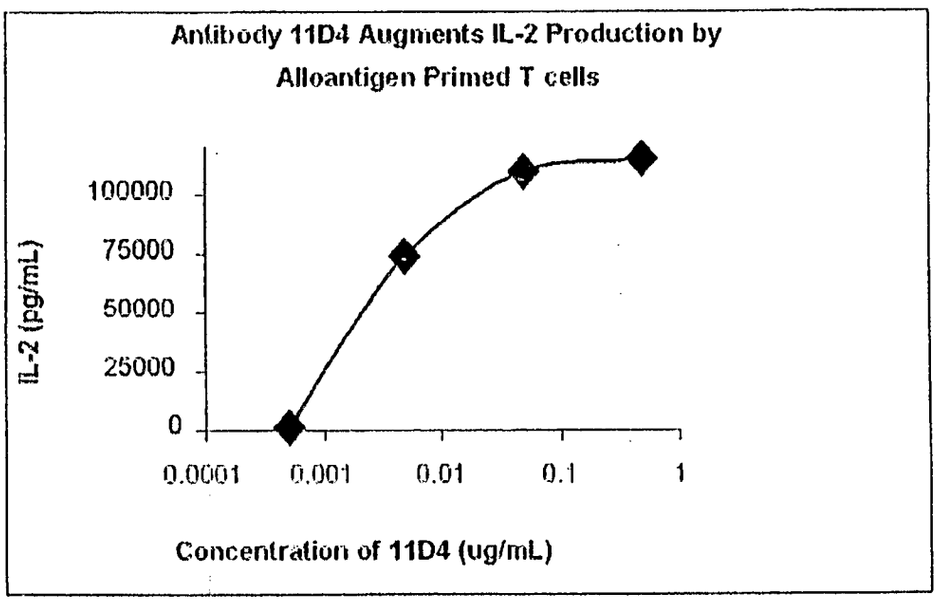


Figure 4.

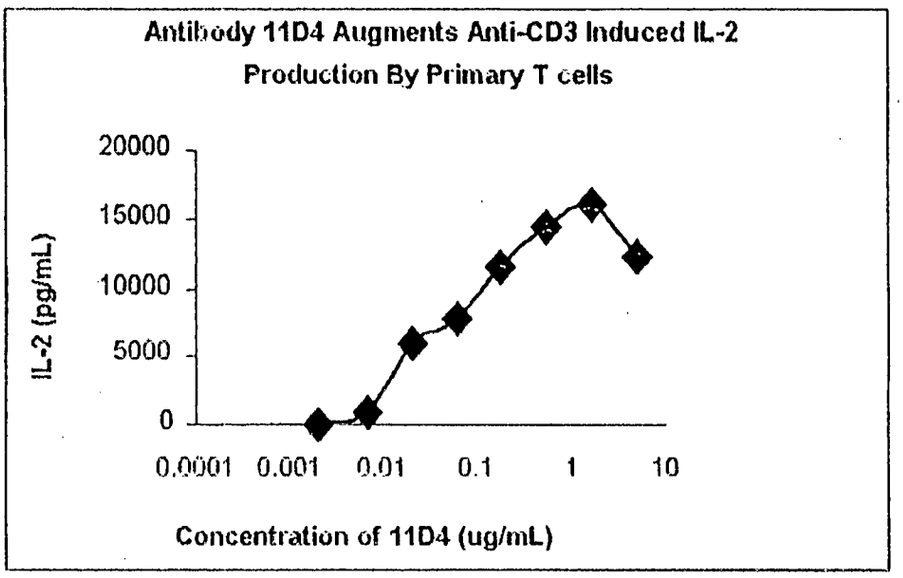



Figure 5.

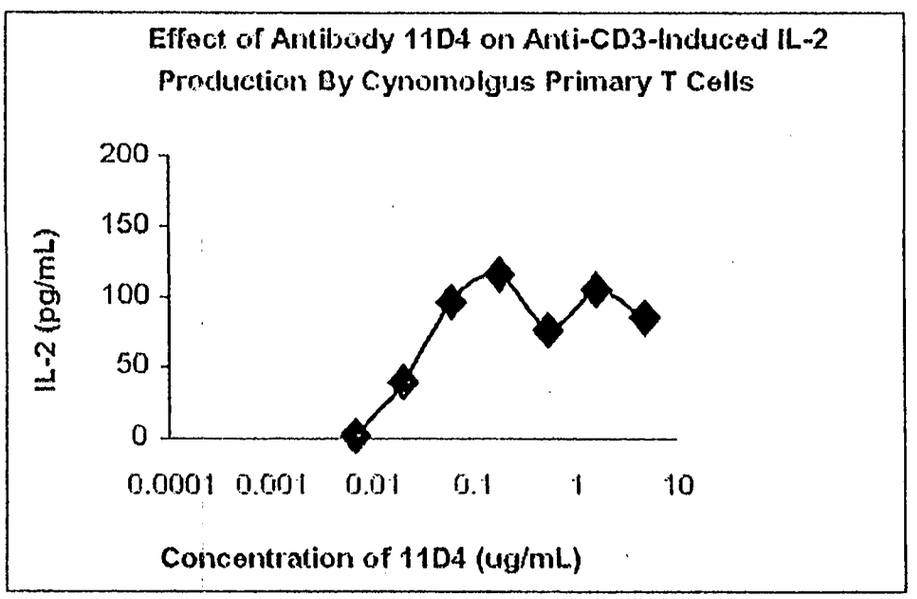


Figure 6.

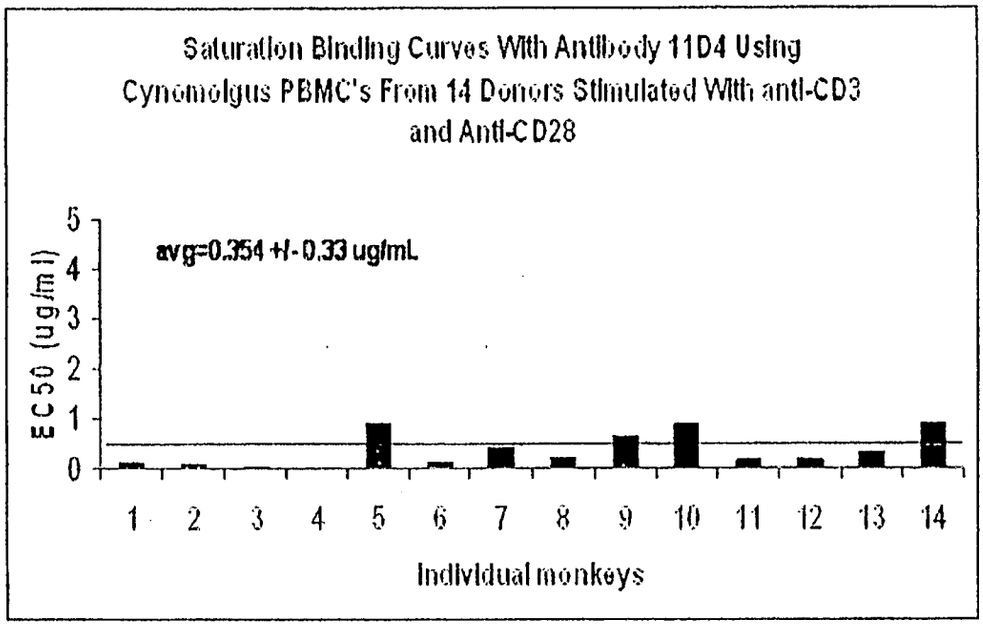



Figure 7.

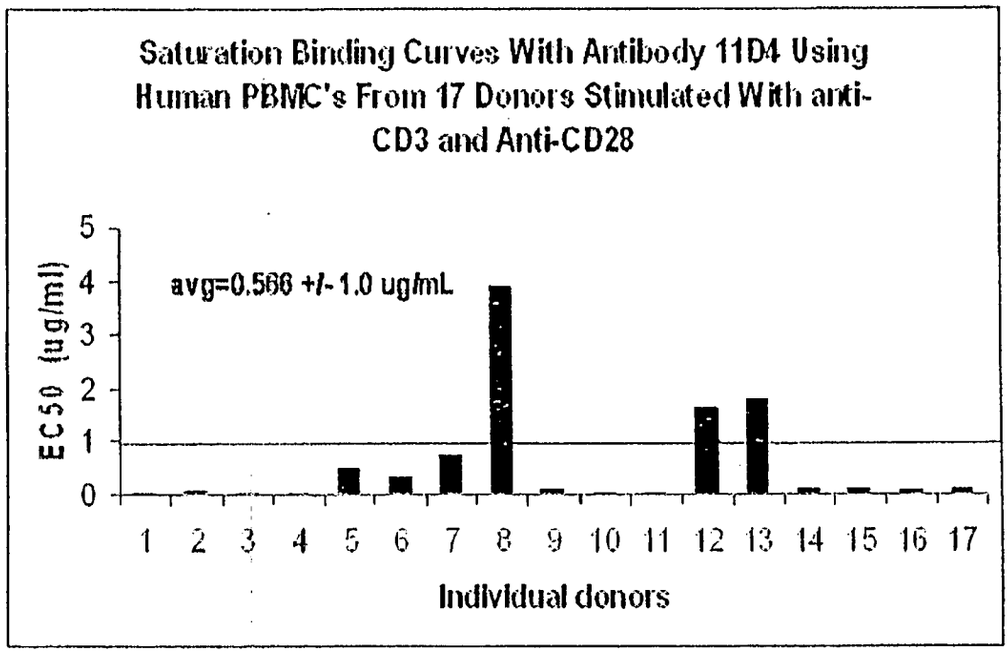


Figure 8.

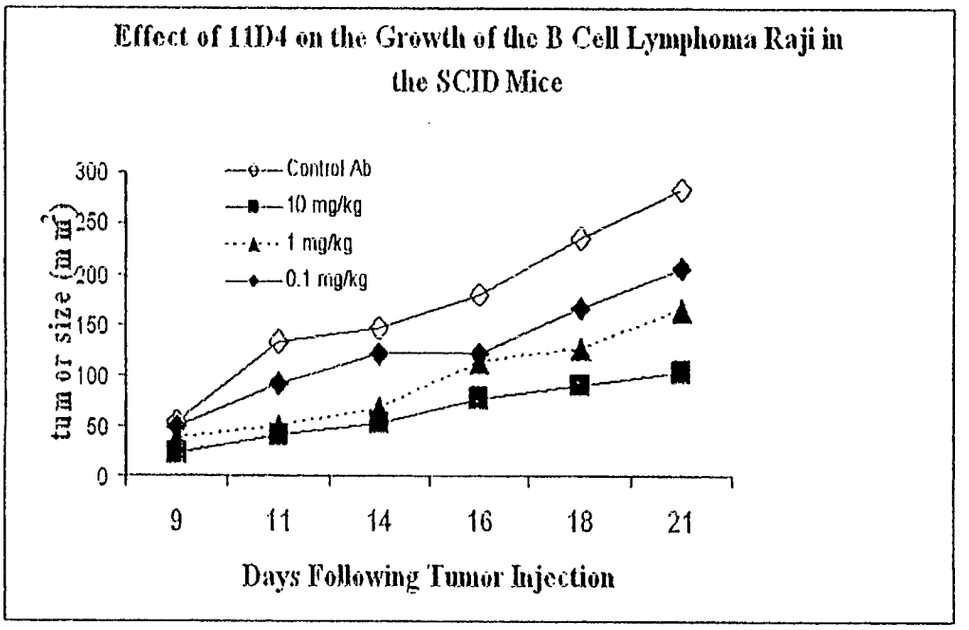



Figure 9.

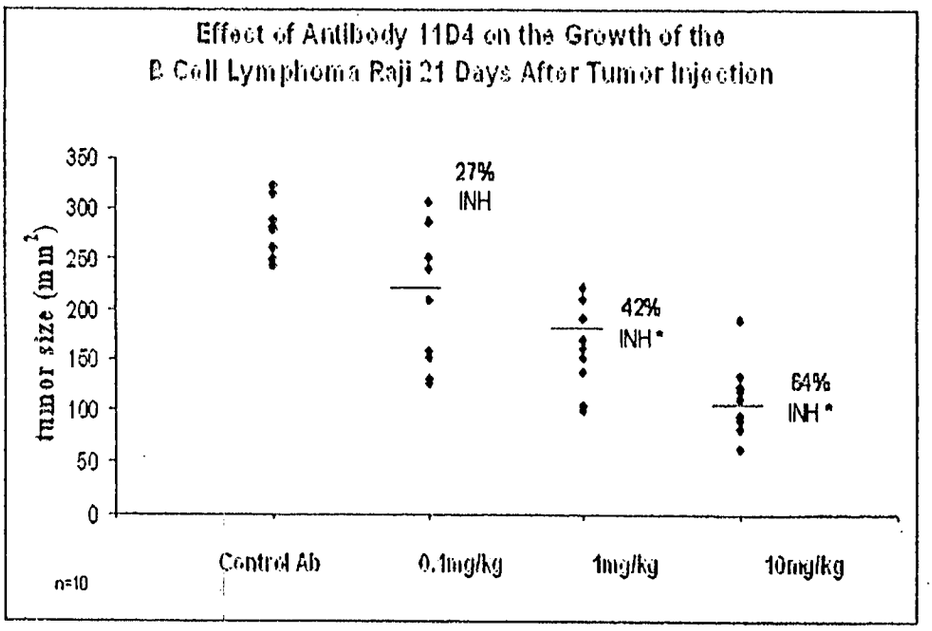


Figure 10.

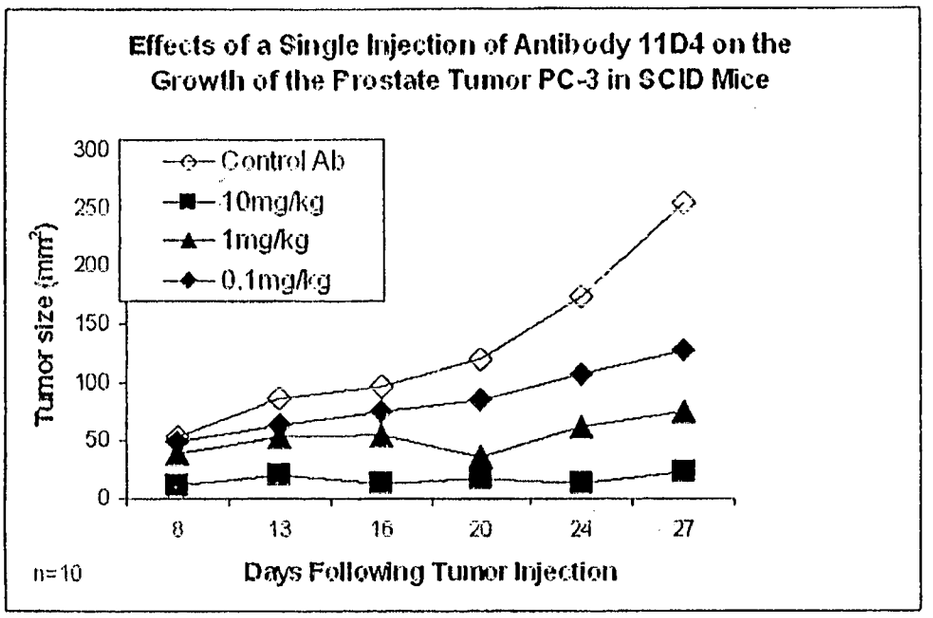



Figure 11.

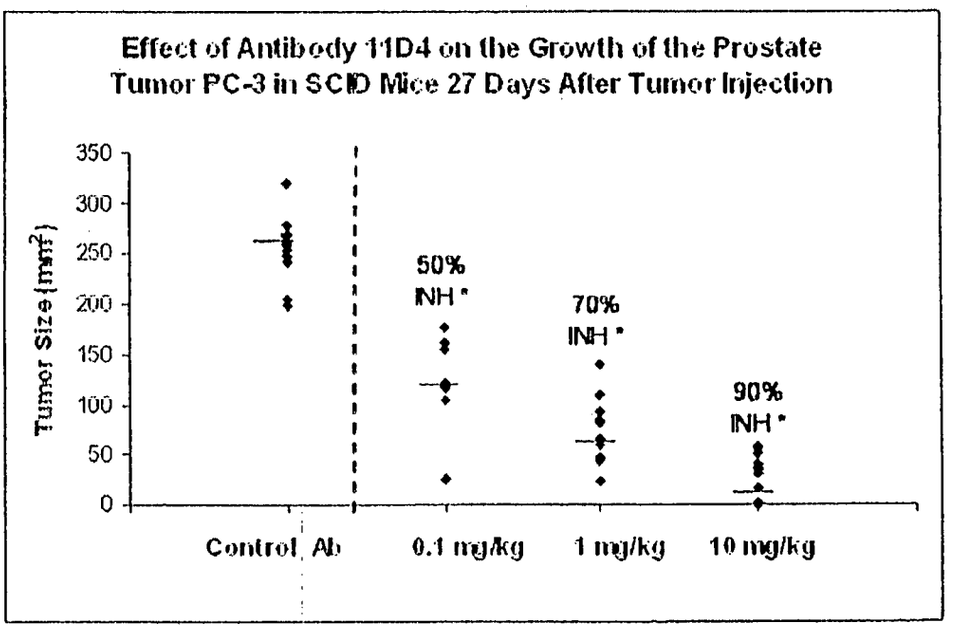


Figure 12.

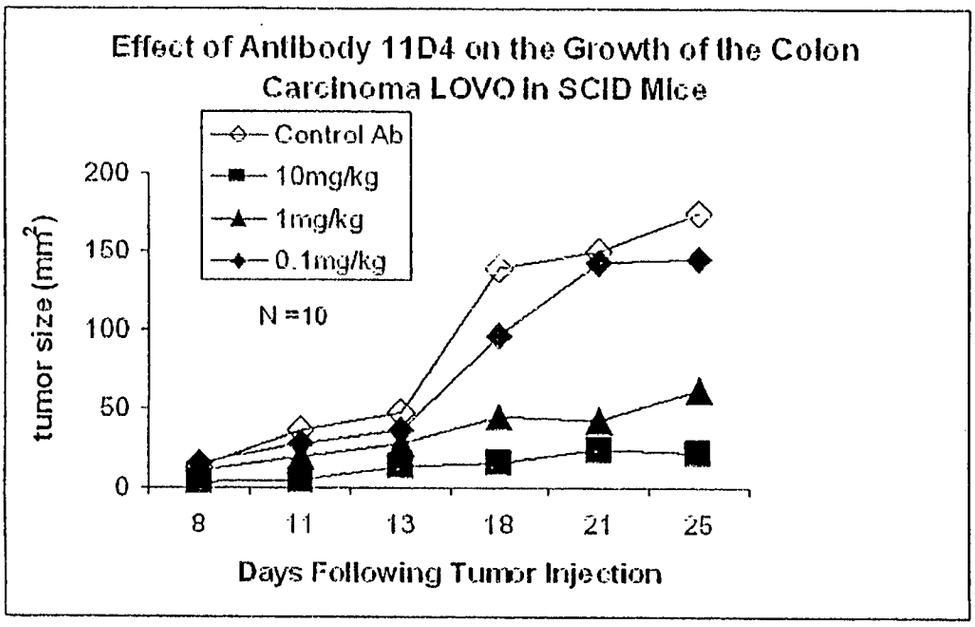



Figure 13.

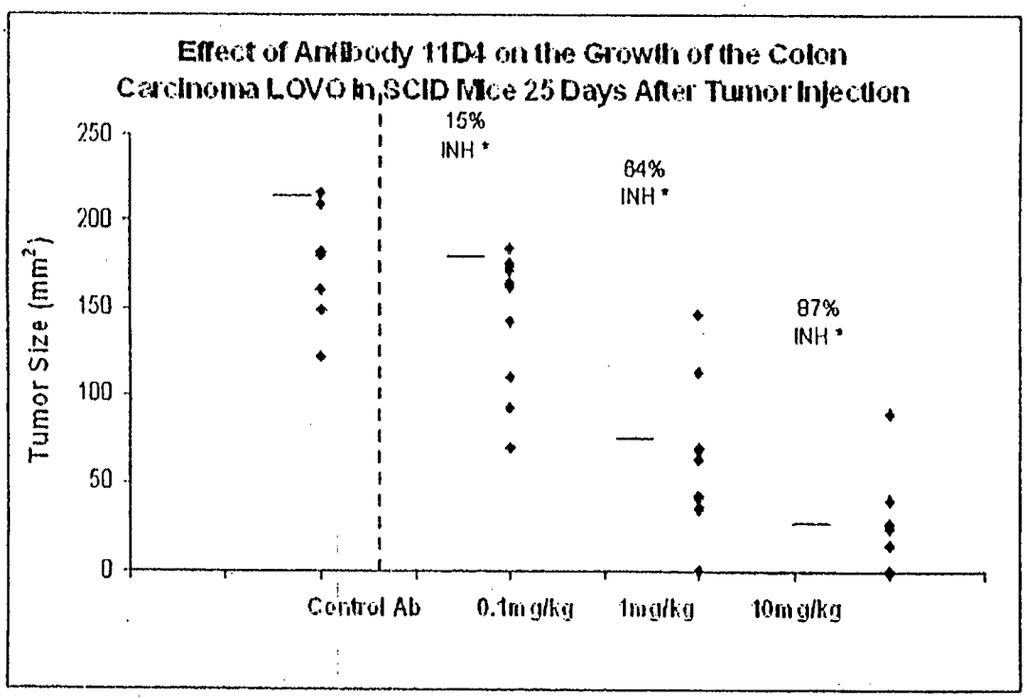


Figure 14.

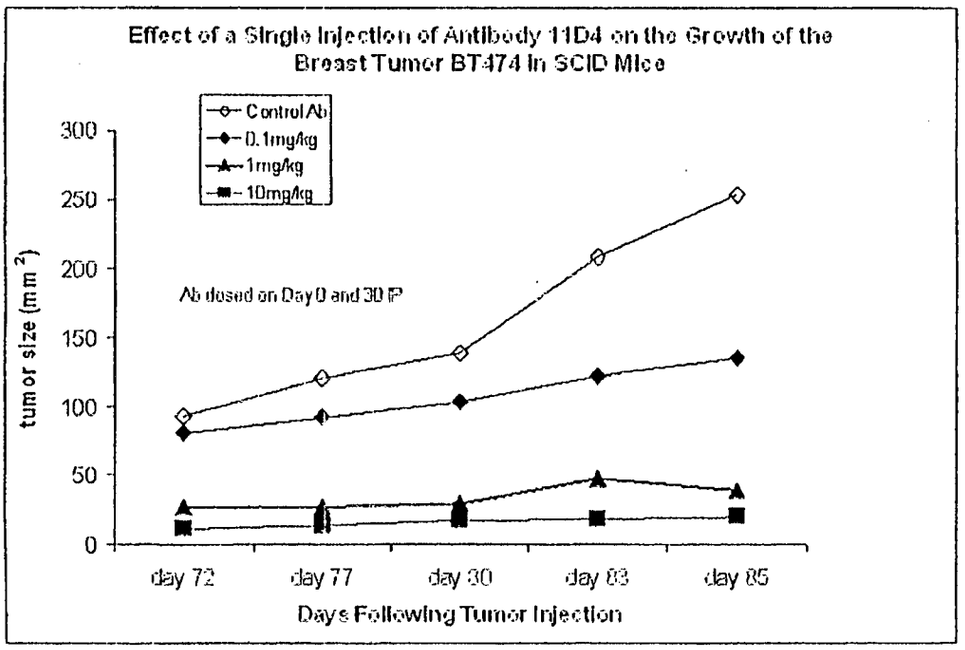
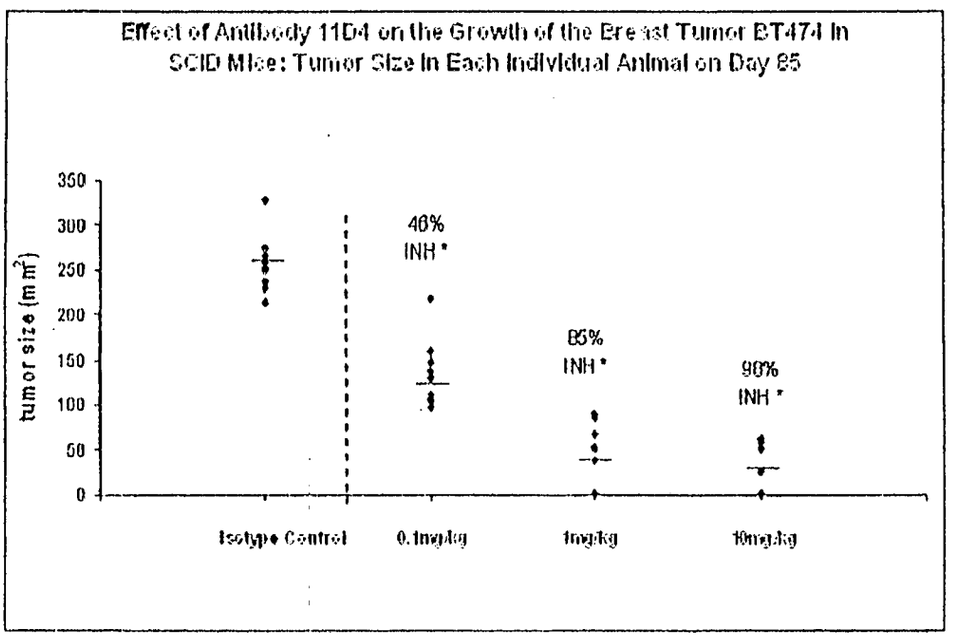



Figure 15.



90

SEQUENCE LISTING

<110> Pfizer Inc. and Medarex Inc.

<120> BINDING MOLECULES TO THE HUMAN OX40 RECEPTOR

<130> PC33601

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Human

<400> 1

Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Human

<400> 2

Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 3

Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr
1 5

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Human

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Human

<400> 5

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

91

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 6

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 7
<211> 118
<212> PRT
<213> Human

<400> 7

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> Human

<400> 8

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 Ile Ser Ser Trp
20 25 30

92

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

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

<210> 9
<211> 444
<212> PRT
<213> Human

<400> 9

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

93

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 10
<211> 214
<212> PRT
<213> Human

<400> 10

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 Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

95

<210> 11
<211> 354
<212> DNA
<213> Human

<400> 11
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc cgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtagtagtac catagactac 180

gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctcactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agacgaggac acggctgtgt attattgtgc gagagaaagc 300

ggctggtacc tctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 12
<211> 321
<212> DNA
<213> Human

<400> 12
gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgtc gggcgagtca gggtattagc agctggttag cctggtatca gcagaaacca 120

gagaaagccc ctaagtccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctccgac tttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Human

<400> 13

Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Human

<400> 14

Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

96

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> Human

<400> 15

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

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Human

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Human

<400> 17

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> Human

<400> 18

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
1 5

<210> 19
<211> 124
<212> PRT
<213> Human

<400> 19

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

97

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

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

Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

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

<210> 20
<211> 106
<212> PRT
<213> Human

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

<210> 21
<211> 450
<212> PRT
<213> Human

<400> 21

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

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

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

98

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

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

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
195 200 205

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
210 215 220

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
290 295 300

99

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 22
<211> 213
<212> PRT
<213> Human

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 23
<211> 372
<212> DNA
<213> Human

<400> 23
gaagtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120

ccagggaagg gcctggaatg ggtctcaggt attagttgga atagtggtag cataggctat 180

gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240

ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagatcag 300

agtacagctg attactactt ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 24
<211> 318
<212> DNA
<213> Human

<400> 24
gaaattgtgg tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgacgtt cggccaaggg 300

accaaggtgg aaatcaaa 318

102

**MOLÉCULAS DE UNIÓN AL RECEPTOR OX40 HUMANO**

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense No. 61/013947 presentada el 14 de diciembre de 2007, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

**Acuerdo de investigación conjunta**

[0002] La descripción y las reivindicaciones de la presente se obtuvieron como resultado de las actividades realizadas dentro del alcance de un acuerdo de investigación conjunto en efecto en o antes de la fecha de la invención reivindicada que realizó entre Pfizer Inc. y Medarex, Inc.

**Antecedentes**

[0003] La presente descripción se refiere a anticuerpos y en particular a anticuerpos que se unen al receptor OX40.

[0004] Aumentar la función de las células T antitumorales representa un nuevo y poderoso abordaje para el tratamiento del cáncer. Los componentes críticos que participan en la generación de una respuesta efectiva de células T antitumorales incluyen aumentar la actividad de células T auxiliar CD4+ para promover la generación de células T citolíticas antitumorales, y proporcionar señales de supervivencia para las células T de memoria y efectoras. Se ha demostrado que un receptor clave media estas respuestas es el receptor OX40. Sugamura, K., Ishii, N., Weinberg, A. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. Nature Rev. Imm. 4: 420-431 (2004); Hori, T. Roles of OX40 in the pathogenesis y control of diseases. Intn. J. Hematology. 83: 17-22 (2006).

[0005] El receptor OX40 (OX40R) (también conocido como

CD134, TNFRSF4, ACT-4, ACT35, y TXGP1L) es un miembro de la superfamilia del receptor TNF. Se ha hallado que OX40R se expresa en las células T activadas CD4+. Se han demostrado cantidades altas de células T OX40R+ dentro de los tumores (linfocitos que infiltran el tumor) y en los nódulos linfáticos drenantes los pacientes con cáncer (Vetto, J.T. et al. 1997. La presencia del marcador de activación de las células T OX-40 sobre los linfocitos que infiltran el tumor y las células de los nódulos linfáticos drenantes de los pacientes con melanoma y cánceres de cabeza y cuello. Am. J. Surg. 174: 258-265; Weinberg, A.D. et al. El compromiso del receptor OX-40 receptor in vivo aumenta la inmunidad antumoral. J. Immunol. 164: 2160-69 (2000); Petty, J.K., et al. La supervivencia del cáncer colorrectal humano se correlaciona con la expresión de la molécula coestimuladora de las células T OX-40 (CD 134). Am. J. Surg. 183: 512-518 (2002)). Se demostró en los modelos tumorales en ratones que el compromiso del OX40R in vivo durante la activación del tumor retrasó significativamente e impidió la aparición de tumores en comparación con el ratón control tratado (Weinberg et al., 2000). En consecuencia, se contempla aumentar la respuesta inmune de un mamífero a un antígeno al comprometer el OX40R mediante el uso de un agente de unión al OX40R (WO 99/42585; Weinberg et al., 2000).

**Síntesis**

[0006] La presente descripción proporciona moléculas de unión aisladas que se unen al OX40R humano, que incluye anticuerpos de OX40R, fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos de OX40R, y los derivados de los anticuerpos de OX40R. En algunas realizaciones la

104

molécula de unión se une al OX40R humano con una $K_D$ de 1 x $10^{-7}$ M o menos y tiene actividad agonista sobre el OX40R humano. En algunas realizaciones adicionales, la molécula de unión es un anticuerpo monoclonal humano se un específicamente al OX40R humano con una $K_D$ de 100 nM o menos.

[0007] La presente descripción también proporciona una composición que comprende una o más de las moléculas de unión y un vehículo aceptable para uso farmacéutico. En algunas realizaciones, la molécula de unión es ais a anticuerpo monoclonal humano de OX40R o uno de sus fragmentos de unión al antígeno. La composición puede comprender adicionalmente agentes farmacéuticos adicionales, tales como agentes quimioterapéuticos, agentes inmunoterapéuticos y agentes terapéuticos homornales.

[0008] La presente descripción además proporciona métodos terapéuticos y diagnósticos usando las moléculas de unión. En algunas realizaciones, la descripción proporciona un método de tratar o prevenir cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de unión o una composición que comprende una molécula de unión. En algunas otras realizaciones, la descripción proporciona un método de mejorar una respuesta inmune en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de unión o una composición que comprende una molécula de unión. En algunas realizaciones particulares la molécula de unión usada en los métodos es un anticuerpo monoclonal humano de OX40R o uno de sus fragmentos de unión al antígeno.

[0009] La presente descripción además proporciona las

105

moléculas de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la una molécula de unión, vectores que comprende dichos ácidos nucleicos, células huésped que comprenden los vectores, y los métodos de preparar las moléculas de unión.

[0010] La descripción también proporciona otros aspectos, que serán evidentes a partir de la descripción completa, que incluye las reivindicaciones.

**Breve descripción de los dibujos**

[0011] Las Figuras 1 a y 1b son gráficos que muestran que el anticuerpo 11D4 se une específicamente al OX40R;

[0012] La Figura 2 es un gráfico que muestra el efecto del anticuerpo entrecruzado 11D4 sobre actividad luciferasa estimulada por OX40R;

[0013] La Figura 3 es un gráfico que muestra el efecto del anticuerpo 11D4 sobre la producción de IL-2 por la células T activadas por aloantígeno;

[0014] La Figura 4 es un gráfico que muestra el efecto del anticuerpo 11D4 sobre la producción de IL-2 inducida por anti-CD3 por las células T primarias;

[0015] La Figura 5 es un gráfico que muestra el efecto de anticuerpo 11D4 sobre la producción de IL-2 inducida por anti-CD3 por las células T primarias de cynomolgus;

[0016] La Figura 6 muestra las curvas de unión de saturación con el anticuerpo 11D4 usando los PBMC de cynomolgus de 14 dadores estimulados con anti-CD3 y anti-CD28;

[0017] La Figura 7 muestra las curvas de unión de saturación con el anticuerpo 11D4 usando PBMC humanos de 17 dadores estimulados con anti-CD3 y anti-CD28;

[0018] La Figura 8 es un gráfico que muestra el efecto del anticuerpo 11D4 sobre el crecimiento del linfoma de células B Raji en ratones SCID;

[0019] La Figura 9 es un gráfico que muestra el efecto de anticuerpo 11D4 sobre el crecimiento del linfoma de células B Raji 21 días después de la inyección del tumor;

[0020] La Figura 10 es un gráfico que muestra los efectos de de una inyección única del anticuerpo 11D4 sobre el crecimiento del tumor de próstata PC-3 en ratones SCID;

[0021] La Figura 11 es un gráfico que muestra el efecto de anticuerpo 11D4 sobre el crecimiento del tumor de próstata PC-3 en ratones SCID 27 días después de la inyección del tumor;

[0022] La Figura 12 es un gráfico que muestra el efecto de anticuerpo 11 D4 sobre el crecimiento del carcinoma de colon LOVO en ratones SCID;

[0023] La Figura 13 es un gráfico que muestra el efecto de anticuerpo 11D4 sobre el crecimiento del carcinoma de colon LOVO en ratones SCID 25 días después de la inyección del tumor;

[0024] La Figura 14 es un gráfico que muestra el efecto

de anticuerpo 11D4 sobre el crecimiento del tumor de mamas BT474 en ratones SCID; y

[0025] La Figura 15 es un gráfico que muestra el efecto de anticuerpo 11 D4 sobre el crecimiento del tumor de mamas BT474 en ratones SCID.

**Definiciones de la descripción detallada**

[0026] El término "agonista" se refiere a una molécula de unión, como se define en la presente, que después de la unión al OX40R, (1) estimula o activa el OX40R, (2) mejora, aumenta, promueve o prolonga una actividad, función o presencia del OX40R, o (3) mejora, aumenta, promueve o induce la expresión del OX40R.

[0027] El término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que normalmente está compuesta de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par que tiene una cadena "liviana" (L) y una "pesada" (H). Las cadenas livianas humanas se clasifican como cadenas livianas kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alpha, o epsilon, y define el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, y IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas livianas y pesadas, las regiones variables y constantes se unen por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, con la cadena pesada que también incluye una región "D" de aproximadamente 3 o más aminoácidos. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como HCVR o $V_H$) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta de tres dominios CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana está compuesta de una región variable de cadena liviana (abreviada en la presente como

LCVR o $V_L$) y una región constante de cadena liviana. La región constante de cadena liviana está compuesta de un dominio, $C_L$. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, que incluyen varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. Las regiones $V_H$ y $V_L$ también se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), interpuestas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada $V_H$ y $V_L$ está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo terminal amino a extremo terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de cada par de cadena pesada/liviana ($V_H$ y $V_L$), respectivamente, forma el sitio de unión del anticuerpo. La asignación de aminoácidos a cada región o dominio está de acuerdo con las definiciones de secuencias Kabat de las proteínas de interés inmunológico (Naciónal Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342:878-883. El término "anticuerpo" abarca un anticuerpo que es parte de un multímero de anticuerpos (una forma multimérica de anticuerpos), tales como dímeros, trímeros, o multímeros de orden superior de los anticuerpos monoméricos. También abarca un anticuerpo que está unido o fijado o asociado de otro modo en forma física o funcional con un resto no anticuerpo. Además, el término "anticuerpo" no está limitado por ningún método particular de producir anticuerpos. Por ejemplo, incluye, entre otros, anticuerpos recombinantes, anticuerpos

monoclonales, y anticuerpos policlonales.

[0028] El término "derivado de anticuerpo" o "derivado" de un anticuerpo se refiere a una molécula capaz de unirse al mismo antígeno (por ejemplo, OX40R) al que se une el anticuerpo y comprende la secuencia de aminoácidos del anticuerpo unido a una entidad molecular adicional. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo que está contenido en el derivado de anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa, o puede ser cualquier porción o porciones de anticuerpo de longitud completa. La entidad molecular adicional puede ser una molécula química o biológica. Los ejemplos de entidades moleculares adicionales incluyen grupos químicos, aminoácidos, péptidos, proteínas (tales como enzimas, anticuerpos), y compuestos químicos. La entidad molecular adicional puede tener cualquier utilidad, tal como para usar como agente de detección, marca, marcador, agente farmacéutico o terapéutico. La secuencia de aminoácidos de un anticuerpo se puede fijar o ligar a una entidad adicional por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente u otra. El término "derivado de anticuerpo" también abarca anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y moléculas que derivan de las modificaciones de las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo de OX40R, tales como sustituciones conservadoras, adiciones e inserciones de aminoácidos.

[0029] El término "fragmento de unión al anticuerpo" de un anticuerpo se refiere a una o más porciones de un anticuerpo de longitud completa que retiene la capacidad de unirse al mismo antígeno (por ejemplo, OX40R) que el anticuerpo al se une. El término "fragmento de unión al anticuerpo" también abarca la porción de un anticuerpo que es parte de una molécula mayor formada por la

asociación covalente o no covalente de la porción del anticuerpo con una o más entidades moleculares adicionales. Los ejemplos de entidades moleculares adicionales incluyen aminoácidos, péptidos, o proteínas, tales como la región del núcleo de estreptavidina, que se puede usar para obtener una molécula scFv tetraméricae (Kipriyanov et al., (1995) Anticuerpos humanos y Hybridomas 6:93-101), un residuo de cisteína, un péptido marcador o una marca polihisdtidina C-terminal, que se pueden usar para obtener moléculas de scFv bivalewntes y biotiniladas Kipriyanov et al., (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058).

[0030] El término "molécula de unión" abarca (1) anticuerpo, (2) fragmento de unión al anticuerpo de un anticuerpo, y (3) derivado de un anticuerpo, cada uno como se define en la presente.

[0031] El término "se une al OX40R" o "unión a OX40R" se refiere a la unión de una molécula de unión, como se define en la presente, al OX40R en un ensayo in vitro, tal como un ensayo BlAcore. Unión significa una afinidad de unión ($K_D$) de 1 x $10^{-6}$ M o menos.

[0032] El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende secuencias de aminoácidos derivadas de dos o más anticuerpos diferentes. Los dos o más anticuerpos diferentes pueden ser de igual especie o de dos o más especies diferentes.

[0033] El término "sustitución conservadora de aminoácidos" se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácidos con otro residuo de aminoácido, en donde los grupos R de la cadena lateral de los dos residuos de aminoácidos tienen propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con

propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; 2) cadenas laterales con hidroxilo alifático: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptofano 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico; y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metiónina. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato, y asparagina-glutamina.

[0034] El término "epitope" se refiere a la parte de un antígeno que es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo, o receptor de células T, o que interactúa de otro modo con una molécula. "Epitope" también es conocido en el arte como "determinante antigénico". Un epitope generalmente consiste en grupos de moléculas químicamente tensioactivas tales como cadenas laterales de aminoácidos o carbohidratos o azúcares y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un epitope puede ser "lineal" o "conformacional". Una vez que se determina un epitope deseado en el antígeno, se pueden generar anticuerpos para este epitope, por ejemplo, usando las técnicas descriptas en la presente. La generación y caracterización de los anticuerpos también puede aclarar información acerca de los epitopes deseables. A partir de esta información, entonces es posible analizar en forma competitiva los anticuerpos para la unión al mismo

112

epitope. Un método para obtener esto es la realización de estudios de competición cruzada para hallar anticuerpos que se unan competitivamente entre sí, es decir, los anticuerpos compiten por la unión al antígeno. Un proceso de alto rendimiento para "clasificar" anticuerpos sobre la base de competición cruzada se describe en la Publicación PCT No. WO 03/48731.

[0035] El término "línea germinal" se refiere a las secuencias de nucleótidos de los genes y segmentos génicos del anticuerpo ya que estos se pasan de padres a hijos por medios de las células germinales. La secuencia de línea germinal se distingue de las secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos en las células B maduras que han sido alteradas por eventos de recombinación e hipermutación durante el curso de la maduración de las células B.

[0036] El término "célula huésped" se refiere a una célula dentro de la cual se ha introducido un vector de expresión. El término abarca no solo la célula sujeto particular sino también la progenie de dicha célula. Ya que se pueden producir ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede no ser idéntica a la célula progenitora, pero aún se incluyen en el alcance del término "célula huésped". El término "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo que consiste en secuencias de aminoácidos de secuencias de inmunoglobulina humana solo. Un anticuerpo humano puede contener cadenas de carbohidratos murinas ya sea producidas en un ratón, en una célula de ratón o en un hibridoma derivado de una célula de ratón. Los anticuerpos humanos se pueden preparar por una variedad de maneras conocidas en el arte.

113

[0037] El término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que contiene residuos de aminoácidos derivados de las secuencias de anticuerpo humanos. Un anticuerpo humanizado puede contener algunas o todas las CDR de un anticuerpo animal no humano mientras que las regiones estructurales y constantes del anticuerpo contienen residuos de aminoácidos derivados de las secuencias del anticuerpo humano.

[0038] El término "mamífero" se refiere a cualquier especie de animal de la clase Mammalia. Los ejemplos de mamíferos incluyen: seres humanos; animales de laboratorio tales como ratas, ratones, simios y cobayos; animales domésticos tales como gatos, perros, conejos, vacunos, ovejas, cabras, caballos y cerdos; y animales salvajes cautivos tales como leones, tigres, elefantes y similares.

[0039] El término "ácido nucleico aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico de origen genómico, ADNc, o sintético o una combinación de estos, que está separada de la otras moléculas de ácido nucleico presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Por ejemplo, con respecto al ADN genómico, el término "aislado" incluye las moléculas de ácido nucleico que están separadas del cromosoma con el que se asocia naturalmente el ADN genómico. Con preferencia, un ácido nucleico "aislado" está libre de secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, secuencia localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico de interés) del ADN genómico del organismo del que deriva el ácido nucleico.

[0040] El término "anticuerpo aislado" o "molécula de unión aislada" se refiere a un anticuerpo o una molécula de unión que: (1) no se asocia con componentes asociados naturalmente que lo acompañan en su estado nativo; (2)

114

está libre de otras proteínas de la misma especie; (3) está expresado por una célula de una especie diferente; o (4) no se produce en la naturaleza. Los ejemplos de anticuerpos aislados incluyen un anticuerpo de OX40R que tiene afinidad purificada usando OX40R, un anticuerpo de OX40P que ha sido generado por los hibridomas u otras líneas celulares in vitro, y un anticuerpo humano OX40R derivado de un animal transgénico.

[0041] El término "$K_D$" se refiere a la constante de disociación de equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular y se usa para describir la afinidad de unión entre un ligando (tal como un anticuerpo) y una proteína (tal como el OX40R). A menor constante de disociación de equilibrio, el ligando se une más estrechamente al ligando o mayor afinidad entre el ligando y la proteína. Se puede medir una $K_D$ por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo usando el sistema BIACORE™. Un procedimiento de ensayo mediante el sistema BIACORE™ (ensayo BIAcore) se describe en la sección de Ejemplos de esta descripción.

[0042] El término "disociación" o "kd" se refiere a la constante de la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Una constante de la velocidad de disociación se puede medir por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo usando el BIACORE™

[0043] El término "anticuerpo de OX40R" se refiere a un anticuerpo, como se define en la presente, capaz de unirse al OX40R humano.

[0044] Los términos "receptor de OX40" y "OX40R" se usan en forma indistinta en la presente solicitud, e incluye el OX40R humano, así como sus variantes, isoformas y especies homólogas. Por consiguiente, las moléculas de

115

unión descriptas en la presente, en ciertos casos, también se pueden unir al OX40R de las especies diferentes del hombre. En otros casos, las moléculas de unión pueden ser completamente específicas para el OX40R humano y no pueden exhibir las especies u otros tipos de reactividad cruzada.

[0045] El término "se une específicamente al OX40R humano" con referencia a la interacción de una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo, con el compañero de unión, por ejemplo, un antígeno, significa que la $K_D$ de una molécula de unión para unirse al CD40, CD137 o CD271 es más de 100 veces la $K_D$ para su unión al OX40R humano, determinado en un ensayo in vitro.

[0046] El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otra molécula de ácido nucleico en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen plásmidos, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, vectores de cósmico o fagos. Algunos vectores son capaces de la replicación autónoma en una célula huésped en la que ellos se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamíferos). Algunos vectores se pueden integrar en el genoma de una célula huésped después de la introducción en la célula huésped, y de este modo se replican junto con el genoma del huésped (por ejemplo, vectores episómicos de mamíferos). Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes en los que están unidos operativamente, y en consecuencia se pueden denominar como "vectores de expresión".

[0047] Como se usa en la presente, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencionale Immunology - A Synthesis (2nd Edición, E.S.

116

Golub y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, MA, (1991)).

[48] **Moléculas de unión que se unen al OX40R humano**

[49] La presente descripción proporciona moléculas de unión aisladas que se unen al OX40R humano, que incluyen anticuerpos de OX40R, fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos de OX40R, y derivados de los anticuerpos de OX40R. Las molécula de unión se caracterizan por al menos una de las siguientes propiedades funcionales: (a) se unen al OX40R humano con una $K_D$ de 1 x $10^{-6}$ M o menos; (b) tienen actividad agonista sobre el OX40R humano; (c) no se unen al Receptor de CD40 a una concentración hasta 500 nM; (d) no se unen al Receptor de CD137 a las concentraciones de hasta 500 nM; (e) no se unen al receptor de CD271 a concentraciones hasta 500 nM; (f) son capaces de aumentar la producción de IL-2 por las células T humanas aisladas; (g) son capaces de aumentar la respuesta inmune; (h) son capaces de inhibir el crecimiento de las células tumorales; e (i) tienen efecto terapéutico sobre el cáncer. En algunas realizaciones las moléculas de unión se unen al OX40R humano con una $K_D$ de 1 x $10^{-7}$ M o menos, o 1 x $10^{-8}$ M o menos, o 5 x 1 x $10^{-9}$ M o menos

[0050] **Anticuerpos de OX40R humano**

[0051] En algunos primeros aspectos, la presente descripción proporciona un anticuerpo humano que se une al OX40R humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo humano es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al OX40R humano con una $K_D$ de 100 nM o menos, con preferencia 10 nM o menos, y tiene actividad agonista del OX40R humano. Un ejemplo de dichos anticuerpos humanos es el anticuerpo monoclonal humano

117

11D4. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada ($V_H$) del anticuerpo 11D4 se muestran en las SEC ID NOs: 9 y 7, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la cadena liviana y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana ($V_L$) del anticuerpo 11D4 se muestran en las SEC ID NOS: 10 y 8, respectivamente. Los isotipos del anticuerpo 11D4 son IgG2 para la cadena pesada y Kappa para la cadena liviana. Los alotipos del anticuerpo 11D4 son G2(n-) para la cadena pesada y Km3 para la cadena liviana. Las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y liviana maduras derivan de la traducción conceptual de las secuencias de ADN de las construcciones de la expresión. El anticuerpo 11D4 no contiene mutaciones estructurales en la cadena pesada o cadena liviana, pero contiene una mutación de la cadena pesada de CDR2.

[0052] Otro anticuerpo ilustrativo de la descripción es el anticuerpo monoclonal humano 18D8. La secuencia de aminoácidos de la región $V_H$ y región $V_L$ del anticuerpo 18D8 se muestra en las SEC ID NOs: 19 y 20, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y cadena liviana se muestra en las SEC ID NOS: 21 y 22, respectivamente.

[0053] Dado que 11D4 y 18D8 se unen al OX40R, las secuencias de $V_H$ y $V_L$ de cada uno de ellos se pueden "mezclar y aparear" con otros anticuerpos de OX40R para crear anticuerpos adicionales. La unión de dichos anticuerpos "mezclados y apareados" al OX40R se puede examinar usando los ensayos de unión conocidos en el arte, que incluyen un ensayo descripto en los Ejemplos. En un caso, cuando las regiones $V_H$ y $V_L$ se mezclan y aparean, una secuencia $V_H$ de un par $V_H/V_L$ particular se

reemplaza con una secuencia de $V_H$ estructuralmente similar. Asimismo, en otro caso una secuencia de $V_L$ de un par $V_H/V_L$ particular se reemplaza con una secuencia de $V_L$ estructuralmente similar.

[0054] Por consiguiente, en algunas realizaciones, la descripción proporciona un anticuerpo aislado de OX40R que comprende: (1) una región variable de cadena pesada del anticuerpo 11D4 o 18D8, (2) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de las SEC ID NOs: 7 o 19, o (3) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de las SEC ID NOs: 11 o 23. En algunas otras realizaciones, la descripción proporciona un anticuerpo aislado de OX40R que comprende: (1) una región variable de cadena liviana del anticuerpo 11D4 o 18D8, (2) una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NOs: 8 o 20, o (3) región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de las SEC ID NOs: 12 o 24.

[0055] En otro aspecto, la descripción proporciona anticuerpos que comprenden CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada ($V_H$) y CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana de 11D4 o 11D8. La secuencia de aminoácidos de $V_H$ de CDR1, $V_H$ de CDR2, y $V_H$ de CDR3 de 11D4 se muestra en las SEC ID NOs: 1, 2, y 3, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de $V_L$ de CDR1, $V_L$ de CDR2, y $V_L$ de CDR3 del anticuerpo 11D4 se muestra en las SEC ID NOs: 4, 5, y 6, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de $V_H$ de CDR1, $V_H$ de CDR2, y $V_H$ de CDR3 del anticuerpo 18D8 se muestra en las SEC ID NOs: 13, 14, y 15, respectivamente. La secuencia de

119

aminoácidos de la $V_L$ de CDR1, $V_L$ de CDR2, y $V_L$ de CDR3 del anticuerpo 18D8 se muestra en las SEC ID NOs: 16, 17, y 18, respectivamente. Las regiones de CDR se delinean usando el sistema Kabat (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

[0056] Dado que 11D4 y 18D8 se unen al OX40R humano y que la especificidad de unión al antígeno está provista principalmente por las regiones de CDR1, CDR2, y CDR3, las secuencias de $V_H$ de CDR1, CDR2 y CDR3 y la secuencias de $V_L$ de CDR1, CDR2 y CDR3 se pueden "mezclar y aparear" para crear anticuerpos de OX40R adicionales. Por ejemplo, las CDR de diferentes anticuerpos de OX40R se pueden mezclar y aparear, si bien cada anticuerpo normalmente contendrá una $V_H$ de CDR1, CDR2, y CDR3 y una $V_L$ de CDR1, CDR2, y CDR3. La unión de dichos anticuerpos "mezclados y apareados" al OX40R se puede analizar por ensayos de unión descriptos anteriormente y en los Ejemplos (por ejemplo, ELISA, análisis Biacore). En un caso, cuando se mezclan y aparean las secuencias de $V_H$ de CDR, las secuencias de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de $V_H$ particular se reemplazan con secuencias de CDR estructuralmente similares. Asimismo, cuando las secuencias de $V_L$ de CDR se mezclan y aparean, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia $V_L$ particular normalmente está reemplazada con secuencias de CDR estructuralmente similares. Será fácilmente evidente para los expertos en el arte que se pueden crear nuevas secuencias de $V_H$ y $V_L$ por la sustitución de una o más secuencias de la región de CDR $V_H$ y/o $V_L$ con secuencias estructuralmente similares a partir de las secuencias de CDR descriptas en la presente.

120

[0057] Por consiguiente, en algunas realizaciones, la descripción proporciona (1) un anticuerpo monoclonal aislado que comprende al menos una CDR seleccionada de la $V_H$ de CDR1, $V_H$ de CDR2, o $V_H$ de CDR3 del anticuerpo 11D4 o 18D8. En algunas otras realizaciones, la descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que comprende al menos una CDR seleccionada de la $V_L$ de CDR1, $V_L$ de CDR2 o $V_L$ de CDR3 del anticuerpo 11D4 o 18D8. En algunas realizaciones adicionales, la descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que comprende al menos una CDR seleccionadas de: una $V_H$ de CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NOs: 1 o 13, o una secuencia que difiere de las SEC ID NOs: 1 o 3 con 1, 2, 3, o 4 sustituciones conservadoras de aminoácidos; una $V_H$ de CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NOs: 2 o 14 o una secuencia que difiere de la SEC ID NOs: 2 o 14 con 1, 2, 3, o 4 sustituciones conservadoras de aminoácidos; y una $V_H$ de CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NOs: 3 o 15 o una secuencia que difiere de las SEC ID NOs: 3 o 15 con 1, 2, 3, o 4 sustituciones conservadoras de aminoácidos.

[0058] En aún otras realizaciones adicionales, la descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que comprende al menos una CDR seleccionada de: una $V_L$ de CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NOs: 4 o 16 o una secuencia que difiere de la SEC ID NOs: 4 o 16 con 1, 2, 3, o 4 sustituciones conservadoras de aminoácidos; una $V_L$ de CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NOs: 5 o 17 o una secuencia que difiere de la SEC ID NOs: 5 o 17 con 1, 2, 3, o 4 sustituciones conservadoras de aminoácidos; y una $V_L$ de CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC

121

ID NOs: 6 o 18 o una secuencia que difiere de la SEC ID NOs: 6 o 18 con 1, 2, 3, o 4 sustituciones conservadoras de aminoácidos.

[0059] En algunos casos, se escinde la lisina C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo de OX40R (Harris R. J., J. of Chromatography, 705: 129-134 (1995)). Las cadenas pesada y/o liviana de los anticuerpos de OX40R opcionalmente pueden incluir una secuencia señal.

[0060] Se pueden determinar las clases (por ejemplo, IgG, IgM, IgE, IgA, o IgD) y subclases (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) de los anticuerpos de OX40R por cualquier método adecuado. En general, se pueden determinar la clase y subclase de un anticuerpo usando anticuerpos que son específicos para una clase y subclase particular de anticuerpo. Dichos anticuerpos están disponibles en el comercio. Se pueden determinar la clase y subclase de un anticuerpo por ELISA, o Western Blot así como otras técnicas. En forma alternativa, se pueden determinar la clase y subclase por la secuenciación del total o de una porción de los dominios constantes de las cadenas pesada y/o liviana de los anticuerpos, por comparación de sus secuencias de aminoácidos a las secuencias de aminoácidos conocidos de varias clases y subclases de las inmunoglobulinas y determinación de la clase y la subclase de los anticuerpos. Los anticuerpos de OX40R pueden ser una molécula de IgG, una IgM, una IgE, una IgA, o una IgD. Por ejemplo, los anticuerpos de OX40R pueden ser una IgG que es una subclase IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. En consecuencia, otro aspecto de la descripción proporciona un método para convertir la clase o subclase de un anticuerpo de OX40R a otra clase o subclase. En algunos casos, una molécula de ácido nucleico que codifica una $V_L$ o $V_H$ que no incluye las

122

secuencias que codifican $C_L$ o $C_H$ se aísla usando métodos bien conocidos en el arte. La molécula de ácido nucleico luego se une operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una $C_L$ o $C_H$ de una clase o subclase de inmunoglobulina deseada. Esto se puede obtener usando un vector o molécula de ácido nucleico que comprende una cadena $C_L$ o $C_H$, como se describió anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo de OX40R que fue originalmente IgM se puede cambiar de clase a una IgG. Además, se puede usar el cambio de clase para convertir una subclase de IgG en otra, por ejemplo, de IgG1 a IgG2. Otro método de producir un anticuerpo que comprende un isotipo deseado comprende las etapas de aislamiento de un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo de OX40R y un ácido nucleico que codifica una cadena liviana de un anticuerpo de OX40R, aislamiento de la secuencia que codifica la región $V_H$, ligamiento de la secuencia $V_H$ que codifica una secuencia que codifica un dominio constante de cadena pesada del isotipo deseado, expresión del gen de cadena liviana y la construcción de cadena pesada en una célula, y recolección del anticuerpo de OX40R con el isotipo deseado.

[0061] **Fragmentos de unión al anticuerpo**

[0062] En otro aspecto, la presente descripción proporciona fragmentos de unión al antígeno de algunos de los anticuerpos humanos OX40R como se describen en la presente anteriormente. En algunas realizaciones, el fragmento de unión al anticuerpo se selecciona de: (1) una cadena liviana de un anticuerpo de OX40R; (2) a cadena pesada de un anticuerpo de OX40R; (3) una región variable de la cadena liviana de un anticuerpo de OX40R; (4) una región variable de la cadena pesada de un

123

anticuerpo de OX40R; (5) uno o más CDR (dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR) de un anticuerpo de OX40R; o (6) tres CDR de la cadena liviana y tres CDR de la cadena pesada de un anticuerpo de OX40R. En algunas realizaciones particulares, la descripción proporciona un fragmento de unión al anticuerpo de anticuerpo 11D4 o 18D8. En algunas otras realizaciones particulares, los fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo de OX40R incluyen: (i) un fragmento de Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios de $V_L$, $V_H$, $C_L$ y $C_H1$; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento de Fd que consiste en los dominios $V_H$ y $C_H1$; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios $V_L$ y $V_H$ de un brazo único de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio $V_H$; (vi) un CDR aislado y (vii) anticuerpo de cadena único (scFv), que es un polipéptido que comprende una región $V_L$ de un anticuerpo unido a una región $V_H$ de un anticuerpo. Bird et al., (1988) Science 242:423-426 y Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883. Un fragmento de unión al anticuerpo también puede comprender dos o más fragmentos más cortos, sean de la misma cadena pesada o misma cadena liviana, o de diferentes cadenas. Los fragmentos de unión al anticuerpo, tales como los fragmentos Fab y $F(ab')_2$, se pueden preparar a partir de anticuerpos totales usando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de los anticuerpos totales. Estos también se pueden obtener mediante técnicas de ADN recombinante, que se describen en la presente.

[0063] **Derivados de anticuerpo**

[0064] En algunos otros aspectos, la presente descripción proporciona derivados de alguno de los anticuerpos de OX40R que se describieron anteriormente en la presente.

[0065] En un aspecto particular, el derivado de anticuerpo deriva de las modificaciones de las secuencias de aminoácidos de 11D4 o 18D8. Se pueden modificar las secuencias de aminoácidos de algunas regiones de las cadenas del anticuerpo, tales como regiones estructurales, regiones de CDR o regiones constantes. Las modificaciones se pueden introducir por técnicas estándares conocidas en el arte, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR y puede comprender aminoácidos naturales así como no naturales.

[0066] Los tipos de modificaciones incluyen sustituciones, inserciones, supresiones o sus combinaciones, de uno o más aminoácidos de un anticuerpo de OX40R. En algunas realizaciones, el derivado del anticuerpo comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácidos de las CDR de la cadena pesada y/o una sustitución de aminoácido en la CDR de la cadena liviana. En algunas realizaciones, un derivado de un anticuerpo de OX40R comprende una o más sustituciones de aminoácidos respecto de la secuencia de aminoácidos de la línea germinal del gen humano. En una realización particular, una o más de estas sustituciones de la línea germinal de la región CDR2 de la cadena pesada. En otra realización particular, las sustituciones de aminoácidos respecto de la línea germinal son en una o más de las mismas posiciones que las sustituciones respecto de la línea germinal de los anticuerpos 11D4 o 18D8. En otra realización, la sustitución del aminoácido es cambiar una o más cisteínas de un anticuerpo por otro residuo, tal como, sin limitación, alanina o serina. La cisteína puede

125

ser cisteína canónica o no canónica. La substitución se puede realizar en una CDR o región estructural de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. Otro tipo de sustitución del aminoácido es eliminar los pares asparagina-glicina, que forman potenciales sitios de desamidación, por alteración de uno o ambos residuos. En otras realizaciones más, la sustitución de aminoácido es una sustitución conservadora de aminoácidos. En una realización, el derivado de anticuerpo tiene 1, 2, 3, o 4 sustituciones conservadoras de aminoácidos en las regiones CDR de la cadena pesada respecto de las secuencias de aminoácidos de 11D4 o 18D8.

[0067] Otro tipo de modificación de un anticuerpo de OX40R es la alteración del patrón de glicosilación original del anticuerpo. El término "alteración" se refiere a la supresión de uno o más restos carbohidratos hallados en el anticuerpo, y/o agregado de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glicosilación de los anticuerpos está normalmente ligada a N. Ligado a N se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un residuo asparagina. La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se obtiene de modo conveniente por la alteración de la secuencia de aminoácidos de modo que esta contenga una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descriptas (para los sitios de glicosilación ligados a N).

[0068] Otro tipo más de modificación incluye la eliminación de algunos restos de carbohidrato presentes en el anticuerpo que se pueden obtener en forma química o enzimática. La desglicosilación química requiere la exposición del anticuerpo a un compuesto, tal como ácido trifluorometansulfónico, o un compuesto equivalente. Este

126

tratamiento produce la escisión de la mayoría o todos los azúcares excepto el azúcar ligador (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que deja el anticuerpo intacto. La desglicosilación química está descripta por Sojahr, H. T., y Bahl, O. P., Arch. Biochem. Biophys. 259 (1987) 52-57 y por Edge, A. S., et al. Anal. Biochem. 118 (1981) 131-137. La escisión enzimática de los restos carbohidratos de los anticuerpos se puede obtener por el uso de una variedad de endo- y exo-glicosidasas descriptas por Thotakura, N. R., y Bahl, O. P., Meth. Enzymol. 138 (1987) 350-359.

[0069] Los ejemplos de otras modificaciones incluyen acetilación, acilación, amidación, entrecruzamiento, ciclización, formación de puente disulfuro, desmetilación, formción de entrecruzamientos covalentes, formación de cistina, formilación, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación y sulfatación.

[0070] En un aspecto adicional, se proporciona un derivado de anticuerpo que comprende un anticuerpo de OX40R, o uno de sus fragmentos de unión al anticuerpo descriptos en la presente, ligados a una entidad molecular adicional. Los ejemplos de entidades moleculares adicionales incluyen agentes farmacéuticos, péptidos o proteínas y agente o marcas de detección. Los ejemplos específicos de agentes farmacéuticos que se pueden ligar a un anticuerpo de OX40R incluyen agentes citotóxicos u otros agentes terapéuticos del cáncer e isótopos radiactivos. Los ejemplos específicos de péptidos o proteínas que se pueden ligar a un anticuerpo de OX40R incluyen anticuerpos, que pueden ser el mismo anticuerpo de OX40R o un anticuerpo diferente. Los

127

ejemplos específicos de agente o marcas de detección que se pueden ligar a un anticuerpo de OX40R incluyen (1) compuestos fluorescentes, tales como fluoresceína, isotiacianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalensulfonilo, ficoeritrina y fósforos de lantánido; (2) enzimas, tales como peroxidasa de rábano, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, y glucosa oxidasa; (3) biotina; (4) un epitope polipeptídico predeterminado reconocido por un indicador secundario, tal como secuencias del par de cierre de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión de metal, y marcas del epitope. En una realización particular, el derivado de anticuerpo es un multímero de anticuerpo de OX40R, que es una forma multimérica de un anticuerpo de OX40R, tal como dímeros de anticuerpos, trímeros, o multímeros de orden superior de anticuerpos monoméricos. Los monómeros individuales dentro de un multímero de anticuerpo pueden ser idénticos o diferentes, es decir, estos pueden ser multímeros de anticuerpos heteroméricos u homoméricos. Los anticuerpos individuales dentro de un multímero pueden tener especificidades de unión iguales o diferentes. La multimerización de los anticuerpos se puede obtener a través de la agregación natural de los anticuerpos. Por ejemplo, algún porcentaje de preparaciones e anticuerpo purificado (por ejemplo, moléculas de IgG1 purificadas) forman espontáneamente agregados de proteína que contienen homodímeros de anticuerpos, y otros multímeros de anticuerpo de orden superior. Alternativamente, los homodímeros de anticuerpos se pueden formar a través de técnicas de ligamiento químico conocidas en el arte, tales como mediante el uso de agentes de entrecruzamiento heterobifuncional. Los agentes de entrecruzamiento

128

adecuados incluyen los que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos reactivos claramente separados por un espaciador apropiado (tal como éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, 4-(maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinidimilo, y S-acetiltioacetato de N-succinimidilo) u homobifuncionales (tales como suberato de disuccinimidilo). Dichos ligadores están disponibles en el comercio en Pierce Chemical Company, Rockford, IL. Los anticuerpos también se pueden multimerizar a través de técnicas de ADN recombinante conocidas en el arte.

[0071] En otro aspecto más, el derivado del anticuerpo es un anticuerpo quimérico, que comprende la secuencia de aminoácidos del Anticuerpo de OX40R humano descripta anteriormente en la presente. En un ejemplo, se combinan una o más CDR de un anticuerpo de OX40R humano con las CDR de un anticuerpo de un animal no humano, tal como ratón o rata. En otro ejemplo, todas las CDR del anticuerpo quimérico derivan de los Anticuerpos de OX40R humanos. En otro ejemplo, las CDR de más de un anticuerpo de OX40R humano se combinan en un anticuerpo quimérico. Además, un anticuerpo quimérico puede comprender las regiones estructurales derivadas de un anticuerpo de OX40R humano y una o más CDR de uno o más anticuerpos humanos diferentes. Los anticuerpos quiméricos se pueden generar usando métodos convencionales conocidos en el arte. En algunas realizaciones particulares, el anticuerpo quimérico comprende uno, dos o tres CDR de la región variable de la cadena pesada o de la región variable de la cadena liviana de un anticuerpo seleccionado del anticuerpo 11D4 o 18D8.

[0072] Los ejemplos de otros derivado de anticuerpos provistos por la presente descripción incluyen

anticuerpos de cadena simple, diacuerpos, anticuerpos de dominio, nanocuerpos y unicuerpos. Un "anticuerpo de cadena simple" (scFv) consiste en una cadena polipeptídica simple que comprende un dominio $V_L$ ligado a un dominio $V_H$ en donde el dominio $V_L$ y el dominio $V_H$ se aparean para formar una molécula monovalente. El anticuerpo de cadena simple se puede preparar de acuerdo con métodos conocidos en el arte (ver, por ejemplo, Bird et al., (1988) Science 242:423-426 y Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Un "diacuerpo" consiste en dos cadenas, cada cadena que comprende una región variable de cadena pesada conectada a una región variable de cadena liviana en la misma cadena polipeptídica conectada por un péptido ligador corto, en donde las dos regiones de la misma cadena no se aparean entre sí pero sino con los dominios complementarios de la otra cadena para formar una molécula biespecífica. Los métodos de preparar diacuerpos son conocidos en el arte (Ver, por ejemplo, Holliger P. et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, y Poljak R. J. et al., (1994) Structure 2:1121-1123). Los anticuerpos de dominio (dAbs) son pequeñas unidades funcionales de ligamiento de los anticuerpos, que corresponden a las regiones variables de las cadenas pesadas o livianas de los anticuerpos. Los anticuerpos de dominio están bien expresados en sistemas celulares de bacterias, levaduras y mamíferos. Otros detalles de los anticuerpos de dominio y sus métodos de producción son conocidos en el arte (ver, por ejemplo, Patentes estadounidenses Nos. 6.291.158; 6.582.915; 6.593.081; 6.172.197; 6.696.245; Patentes europeas 0368684 & 0616640; WO05/035572, WO04/101790, WO04/081026, WO04/058821, WO04/003019 y WO03/002609. Los nanocuerpos

derivan de las cadenas pesadas de un anticuerpo. Un nanocuerpo normalmente comprende un dominio variable simple y dos dominios constantes (CH2 y CH3) y retiene la capacidad de unirse al antígeno del anticuerpo original. Los nanocuerpos se pueden preparar por métodos conocidos en el arte (Ver, por ejemplo, Patente estadounidense No. 6.765.087, Patente estadounidense No. 6.838.254, WO 06/079372). Los unicuerpos consisten en una cadena liviana y una cadena pesada de un anticuerpo IgG4. Los unicuerpos se pueden obtener por la eliminación de la región bisagra de los anticuerpos IgG4. Otros detalles de los unicuerpos y los métodos de prepararlos se pueden hallar en WO2007/059782.

[0073] **Métodos de producir las moléculas de unión**

[0074] Las moléculas de unión descriptas en la presente se pueden producir por técnicas conocidas en el arte, que incluyen la metodología de anticuerpo monoclonal convencional, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas estándar de Kohler y Milstein (Nature 256: 495, (1975)), así como otras técnicas tales como la transformación viral u oncogénica de los linfocitos B.

[0075] **Inmunización de animales no humanos**

[0076] La descripción también proporciona un método para obtener anticuerpos de OX40R o sus fragmentos de unión al antígeno, que comprende inmunizar un animal no humano que comprende el locus de la inmunoglobulina humana con un antígeno de OX40R, y aislar el anticuerpo del animal inmunizado o de las células derivadas del animal inmunizado.

[0077] Los ejemplos de animales no humanos adecuados incluyen un animal transgénico o transcromosómico, tal

131

como HuMAb de ratón, KM de ratón, "TC de ratones" y Xenomouse™. El HuMAb de ratón (Medarex, Inc.) contiene los minilocus del gen de inmunoglobulina humana que codifican las secuencias de inmunoglobulina humana de cadena pesada (μ y γ) y cadena liviana κ humanas no reordenadas junto con las mutaciones específicas que inactivan los locus de la cadena μ y κ endógenos (ver por ejemplo, Lonberg, et al. (1994) Nature 368: 856-859). Por consiguiente, los ratones que exhiben expresión reducida de IgM o k de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y liviana humana introducidos experimentan cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgGκ humanos de alta afinidad (Ver, por ejemplo, Harding, F. y Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546). La preparación y uso del HuMAb Mouse®, y las modificaciones genómicas realizadas por dichos ratones, son bien conocidos en el arte (Ver, por ejemplo, Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851). Los KMmice™ portan un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena liviana humana y se describen con detalle en WO 02/43478. El Xenomouse™ (Abgenix, Inc.) contiene grandes fragmentos de los locus de la inmunoglobulina humana y es deficiente la producción de anticuerpos humanos. Este modelo animal es bien conocido en el arte (Ver, por ejemplo, Patentes estadounidenses Nos: 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584; y 6.162.963). Los "ratones TC" también son ratones manipulados genéticamente que portan un transcromosoma de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena liviana humana. Dichos ratones se describen en Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727.

[0078] El antígeno de OX40R para usar en la

inmunización del animal puede ser OX40R aislado y/o purificado y es con preferencia un OX40R humano. En una realización, el antígeno de OX40R es un fragmento del OX40R humano, con preferencia el dominio extracelular del OX40R. En otra realización, el antígeno de OX40R es un fragmento que comprende al menos un epitope del OX40R humano. En otra realización, es antígeno de OX40R es una célula que expresa OX40R en su superficie celular, más particularmente una célula que sobreexpresa el OX40R en su superficie celular. La inmunización de los animales se puede realizar por cualquier método adecuado conocido en el arte. (Ver, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990). Los métodos particulares para inmunizar animales no humanos tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, vacunos y caballos son bien conocidos en el arte (Ver, por ejemplo, Harlow y Lane (1990); Patente estadounidense No. 5.994.619). El ejemplo proporciona un métodos para inmunizar ratones HuMab.

[0079] Después de la inmunización del animal con un antígeno de OX40R, se pueden obtener los anticuerpos y/o células productoras de anticuerpo del animal. En una realización, el suero se obtiene del animal y se puede obtener una fracción de inmunoglobulina del suero o los anticuerpos de OX40R se pueden purificar del suero.

[0080] Los anticuerpos de OX40R también se pueden producir usando células inmortalizadas productoras de anticuerpo que se prepara a partir de células aisladas del animal inmunizado. Después de la inmunización, se recogen el ganglio linfático y/o células B esplénicas del animal y se inmortalizan por medios adecuados. Los métodos de inmortalizar células incluyen, pero sin limitación, trasnfectarlas con oncogenes, infectarlas con

133

un virus oncogénico y cultivarlas en condiciones para seleccionar las células inmortalizadas, someterlas a compuestos carcinogénicos o mutantes, fusionarlas con una célula inmortalizada, por ejemplo, una célula de mieloma, e inactivar un gen supresor del tumor (Ver, por ejemplo, Harlow y Lane, supra). En una realización particular, las células B esplénicas recolectadas del animal inmunizado se fusionan con las células de mieloma inmortalizadas para formar hibridomas inmortalizados productores de anticuerpos. Las células de mieloma con preferencia no secretan polipéptidos de la inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Los hibridomas inmortalizados se analizan usando el antígeno OX40 (por ejemplo, el OX40R, a porción de este o una célula que expresa el OX40R). El análisis inicial se puede realizar, por ejemplo, usando un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo. Se describe un ejemplo de ELISA en WO 00/37504.

[0081] Las células productoras del anticuerpo de OX40R, por ejemplo, los hibridomas, se selección, clonan y posteriormente se analizan para determinar las características deseables, que incluyen crecimiento robusto, alta producción de anticuerpos y características de anticuerpo deseables, que se describen a continuación. Los hibridomas se pueden expandir in vivo en animales singeneicos, en animales que carecen de sistema inmune, por ejemplo, ratones atímicos o en cultivo celular in vitro.

[0082] En consecuencia, se proporcionan métodos para producir una célula que produce un anticuerpo monoclonal humano de OX40R o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que comprende: (a) inmunizar un animal transgénico no humano con un antígeno de OX40R; (b)

permitir que el animal desarrolle una respuesta inmune al antígeno de OX40R; (c) aislar las células productoras de anticuerpo del animal; y (d) inmortalizar las células productoras de anticuerpo. En una realización, el método además comprende (e) crear poblaciones monoclonales individuales de las células inmortalizadas productoras de anticuerpos; y (f) analizar las célulascélulas inmortalizadas productoras de anticuerpos que producen el anticuerpo de OX40R deseado.

[0083] **Ácido nucleicos, vectores, células huésped y métodos recombinantes de producir anticuerpos OX40R**

[0084] Otro aspecto de la descripción proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica la secuencia de aminoácidos de la una molécula de unión que se une al OX40R humano. La secuencia de aminoácidos codificada por la molécula de ácido nucleico puede ser cualquier porción de un anticuerpo intacto, tal como una CDR, una secuencia que comprende uno, dos o tres CDR, o una región variable de una cadena pesada o cadena liviana, o puede ser una cadena pesada o cadena liviana de longitud completa. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos que comprende (1) una región CDR3, en particular una región CDR3 de cadena pesada de los anticuerpos 11D4 o 18D8; (2) una región variable de una cadena pesada o región variable de una cadena liviana de anticuerpos 11D4 o 18D8; o (3) una cadena pesada o una cadena liviana de los anticuerpos 11D4 o 18D8. En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,

20, 21, y 22. En otras realizaciones más, la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 11, 12, 23, y 24.

[0085] Las moléculas de ácidos nucleicos provista por la descripción se puede obtener de cualquier fuente que produce un anticuerpo de OX40R. El ARNm del anticuerpo de células productoras de OX40R se puede aislar por técnicas estándares, clonar y/o amplificar usando PCR y técnicas de construcción de bibliotecas, y analizar usando protocolos estándares para obtener las moléculas de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de OX40R. El ARNm se puede usar para producir ADNc para usar en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o clonación de ADNc de los genes del anticuerpo. En una realización, la molécula de ácido nucleico se obtiene de un hibridoma que expresa un anticuerpo de OX40R, descripto anteriormente, con preferencia un hibridoma que tiene como uno de sus compañeros de fusión una célula animal transgénica no humana que expresa genes de inmunoglobulina humana. En otra realización, el hibridoma deriva de un animal no transgénico no humano.

[0086] Una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo de OX40R se puede construir por la fusión de una molécula de ácido nucleico que codifica la región variable pesada con una molécula de ácido nucleico que codifica una región constante de una cadena pesada. De modo similar, una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena liviana de un anticuerpo de OX40R se puede construir por la fusión de una molécula de ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena liviana con una molécula de ácido nucleico que codifica una región constante de una cadena liviana. Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las cadenas

136

$V_H$ y $V_L$ se pueden convertir en genes de anticuerpo de longitud completa la insertarlas en los vectores de expresión que ya codifican las regiones constantes de la cadena pesada y constantes de cadena livianas, respectivamente, de modo que el segmento $V_H$ esta unido operativamente a los segmentos de la región constante de cadena pesada ($C_H$) dentro del vector y el segmento $V_L$ está unido operativamente al segmento de la región constante de cadena liviana ($C_L$) dentro del vector. En forma alternativa, Las moléculas de ácidos nucleicos que codifica las cadenas $V_H$ o $V_L$ se convierten en genes del anticuerpo de longitud completa por ligamiento, por ejemplo, ligando las moléculas de ácidos nucleicos que codifican una cadena $V_H$ con una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena $C_H$ mediante técnicas biológicas moleculares estándares. Lo mismo se puede obtener usando las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas $V_L$ y $C_L$. Las secuencias de los genes humanos de la región constante de la cadena pesada y liviana son conocidas en el arte. Ver, por ejemplo, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., NIH Publ. No. 91-3242, 1991. Las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y/o livianas de longitud completa se pueden expresar a partir de una célula en la que se han introducido y se aísla el anticuerpo de OX40R.

[0087] Las moléculas de ácidos nucleicos se puede usar para expresar en forma recombinante grandes cantidades de anticuerpos de OX40R, como se describe más adelante. Las moléculas de ácidos nucleicos también se pueden usar para producir otras moléculas de unión provistas por la descripción, tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpo de cadena simple, inmunoadhesinas, diacuerpos,

anticuerpos mutados y derivados de anticuerpos, como se describe en otra parte de la presente. En una realización, se usa una molécula de ácido nucleico como sonda o cebador de PCR para las secuencias específicas del anticuerpo. Por ejemplo, se puede usar una sonda de ácido de molécula de ácido nucleico en métodos diagnósticos o un cebador de PCR de molécula de ácido nucleico para amplificar regiones del ADN que se podría usar, entre otros, para aislar las secuencias de ácidos nucleicos para usar en la producción de las regiones variables de los anticuerpos de OX40R.

[0088] Una vez que se obtienen las moléculas de ADN que codifican los segmentos de $V_H$ y $V_L$ de un anticuerpo de OX40R, estas moléculas de ADN se pueden manipular adicionalmente por técnicas de ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en genes de la cadena del anticuerpo de longitud completa, a genes del fragmento Fab o un gen de scFv. En estas manipulaciones, una molécula de ADN que codifica $V_L$ o $V_H$ está unida operativamente a otra molécula de ADN que codifica otro polipéptido, tal como una región constante de un anticuerpo o un ligador flexible. El término "unido operativamente," como se usa en este contexto, significa que las dos moléculas de ADN se unen de modo tal que las secuencias de aminoácidos codificadas por las moléculas de ADN permanezcan en marco.

[0089] La molécula de ADN aislada que codifica la región $V_H$ se puede convertir en una gen de cadena pesada de longitud completa por unión operativa de la molécula de ADN que codifica $V_H$ a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las sècuencias de los genes de la región constante de cadena pesada son conocidos en el arte (ver, por

ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edición, U.S. Department of Health y Human Services, NIH Publicación No. 91-3242) y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener por amplificación PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero can mayor preferencia es una región constante de IgG1 o IgG2. La secuencia de región constante de IgG1 puede ser cualquiera de los diversos alelos o alotipos conocidos que se producen entre individuos diferentes, tales como Gm(1), Gm(2), Gm(3) y Gm(17). Estos alotipos representan sustituciones de aminoácidos naturales en las regiones constantes de IgG1. Para un gel del fragmento Fab de cadena pesada, el ADN que codificador de $V_H$ puede estar unido operativamente a otra molécula de ADN que codifica solo la región constante de la cadena pesada CH1. La región constante de la cadena pesada CH1 puede derivar de algunos de los genes de la cadena pesada.

[0090] La molécula de ADN aislada que codifica la región $V_L$ se puede convertir en un gen de cadena liviana de longitud completa (así como un gen de la cadena liviana de Fab) por la unión operativa de la molécula de ADN que codifica $V_L$ a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena liviana, $C_L$. Las secuencias de la genes de la región constante de cadena liviana humana son conocidos en el arte (ver por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edición, U.S. Department of Health y Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener por amplificación PCR estándar. La región constante de cadena

liviana puede ser una región constante kappa o lambda. La región constante kappa puede ser cualquiera de los diversos alelos conocidos que se producen entre individuos diferentes, tales como Inv(1), Inv(2), y Inv(3). La región constante lambda puede derivar de cualquiera de los tres genes lambda.

[0091] Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican $V_H$ y $V_L$ están unidos operativamente a otro fragmento que codifica un ligador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4 -Ser)3, de modo que las secuencias de $V_H$ y $V_L$ se puedan expresar como una proteína de cadena simple contigua, con las regiones $V_L$ y VH unidas por el ligador flexible (Ver por ejemplo, Bird et al., (1988) Science 242:423-426; Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554). El anticuerpo de cadena simple puede ser monovalente, si solo se usan $V_H$ y $V_L$ solas, bivalentes, si se usan dos $V_H$ y $V_L$, o polivalentes si se usan más de dos $V_H$ y $V_L$. Se pueden generar los anticuerpos biespecíficos o polivalentes que se unen específicamente al OX40R y a otra molécula.

[0092] En otro aspecto, la presente descripción proporciona un vector, que comprende una molécula de ácido nucleico descripta anteriormente en la presente. La molécula de ácido nucleico puede codificar una porción de una cadena liviana o cadena pesada (tal como una CDR o una región variable), una cadena liviana o pesada de longitud completa, polipéptido que comprende una porción o una cadena pesada o liviana de longitud completa, o la secuencia de aminoácidos de un derivado de anticuerpo o fragmento de unión al anticuerpo. Para expresar una molécula de unión, una molécula de ADN que codifica una

molécula de unión parcial o de longitud completa se inserta en un vector de expresión de modo que la molécula de ADN esté unida operativamente a las secuencias de control de la transcripción y traducción. En este contexto, el término "unido operativamente" significa que la molécula de ADN está ligada en un vector de modo que las secuencias de control de transcripción y traducción dentro del vector cumplen su función esperada de regulación de la transcripción y traducción de la molécula de ADN. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen por ser compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. Los vectores de expresión incluyen, por ejemplo, plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus de planta tales como virus del mosaico de coliflor, virus del mosaico de tabaco, cósmidos, episomas derivados de YAC y EBV. La molécula de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana y la molécula de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se puede insertar en vectores separados o en el mismo vector. La molécula de ADN se inserta en el vector de expresión por cualquier método adecuado (por ejemplo, ligamiento de sitios de restricción complementarios sobre los fragmentos y vectores del gen del anticuerpo o ligamiento de extremos romos si no están presentes los sitios de restricción).

[0093] Un ejemplos de un vector de expresión adecuado es uno que codifica una secuencia de inmunoglobulina $C_H$ o $C_L$ humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados manipulados genéticamente de modo que se pueda insertar y expresar cualquier secuencia de $V_H$ o $V_L$. El vector de expresión también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la secuencia de

aminoácidos de la cadena del anticuerpo de una célula huésped. El ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de una cadena de anticuerpo se puede clonar en el vector de modo que el péptido señal se liga en marco con el extremo amino terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena del anticuerpo. El péptido señal pueden se un péptido señal inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

[0094] Además de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de OX40R (genes de la cadena de anticuerpo), los vectores de expresión portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo de la célula huésped. El diseño del vector de expresión, que incluye la selección de secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped transformada, el nivel de expresión de proteína deseado y similares. Las secuencias reguladoras para la expresión de la célula huésped de mamíferos incluye elementos virales que dirigen altos niveles de la expresión de proteína en las células mamíferas, tales como los promotores y/o potenciadores derivados de LTR retrovirales, citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/potenciador de CMV), virus simio 40 (SV40) (tales como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío mayor del adenovirus (AdMLP)), de polioma y promotores potentes de mamíferos tales como promotores de inmunoglobulina nativa y actina. Para mayor descripción de los elementos reguladores virales y sus secuencias, ver por ejemplo, Patentes estadounidenses Nos. 5.168.062, 4.510.245, y 4.968.615.

[0095] Además de las secuencias de ácidos nucleicos de la

cadena del anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante pueden portar secuencias adicionales, tales como las secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped y los genes del marcador seleccionable. El gen del marcador seleccionable facilita la selección de las células huésped en el que se ha introducido el vector (ver por ejemplo, Patentes estadounidenses Nos. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Los genes del marcador seleccionable incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped dhfr con selección/amplificación con metotrexato), el gen de neomicina fosoftransferasa (para la selección de G418), y el gen de glutamato sintetasa. El diseño del vector de expresión, que incluye la selección de secuencias reguladoras, puede depender de numerosos factores, tales como la elección de la célula huésped transformada, el nivel deseado de expresión de proteína y demás. Las moléculas de ácido nucleico que codifica moléculas de unión y vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico se pueden usar para la transformación de una célula huésped adecuada para la producción recombinante de una molécula de unión. Una célula huésped adecuada se transforma con uno o más vectores de expresión que porta las moléculas de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de una molécula de unión de modo que la secuencia de aminoácidos se expresa en la célula huésped y, normalmente, se secreta en el medio en el que se cultiva la célula huésped y de dichos medio se puede recuperar la secuencia de aminoácidos. La transformación de las células huésped se puede llevar a cabo por cualquiera de los métodos adecuado conocidos en el arte, tales como los que se describen en las Patentes

estadounidenses Nos. 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461, y 4.959.455.

[0096] La célula huésped puede ser una célula de mamífero, insecto, planta, bacteria o levadura. Los ejemplos de líneas celulares de mamífero adecuadas como células huésped incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células NSO, células SP2, células HEK-293T, células NIH-3T3, células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono verde de africano (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549 y numerosas líneas de células. Los ejemplos de líneas de células de insecto incluyen células Sf9 o Sf21. Los ejemplos de células huésped de planta incluyen Nicotiana, Arabidopsis, lenteja de agua, maíz, trigo, papa y demás. Las células huésped bacterianas incluyen especies de E. coli y Streptomyces. Los ejemplos de células huésped de levaduras incluyen Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces cerevisiae, y Pichia pastoris.

[0097] Las secuencias de aminoácidos de una molécula de unión expresadas por líneas de células diferentes o en animales transgénicos pueden tener diferente glicosilación. Sin embargo, todas las moléculas de unión codificadas por las moléculas de ácidos nucleicos provistas en la presente, o que comprenden las secuencias de aminoácidos provistas en la presente son parte de la presente invención, independientemente de la glicosilación de las moléculas de unión.

[0098] En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para producir un anticuerpo de OX40R o su fragmento de unión al anticuerpo usando despliegue de fagos. El método comprende (a) sinterizar una biblioteca de anticuerpos humanos en fago, (b)

identificar la biblioteca con el OX40R o una porción de este, (c) aislar el fago que se une a OX40R o una porción de este, y (d) obtener el anticuerpo del fago. Un ejemplo de método para preparar la biblioteca de anticuerpos comprende el paso de: (a) inmunizar un animal no humano que comprende los locus de la inmunoglobulina humana con OX40R o una de sus porciones antigénicas para crear una respuesta inmune; (b) extraer las células productoras del anticuerpo del animal inmunizado; (c) aislar el ARN que codifica las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos de OX40R de las células extraídas; (d) transcribir en forma reversa el ARN para producir ADNc; (e), amplificar el ADNc; y (f) insertar el ADNc en un vector de despliegue de fagos de modo que los anticuerpos se expresan en el fago. Los anticuerpos recombinantes de OX40R humanos o us fragmentos de unión al antígeno se pueden aislar por la identificación de una biblioteca de anticuerpos combinatorio recombinante. La biblioteca puede ser una biblioteca de despliegue de fagos scFv, generads usando los ADNc de $V_L$ y $V_H$ preparados a partir del ARNm de las células B. Los métodos para preparar y seleccionar dichas bibliotecas son conocidos en el arte. Los kit para generar bibliotecas de despliegue en fago están disponibles en el comercio (por ejemplo, Pharmacia Recombinant Phage Anticuerpo System, catálogo no. 27-9400-01; y el kit de despliegue en fago Stratagene SurfZAP™, catálogo no. 240612).

[0099] En un caso, para aislar y producir anticuerpos de OX40R humanos con las características deseadas, primero se usa un anticuerpo de OX40R humano como se describe en la presente para seleccionar las secuencias de cadena pesada y liviana humanas que tiene actividad de unión similar hacia OX40R usando los métodos conocidos en el

arte, tales como métodos de impresión de huellas del epitope descriptos en WO 93/06213. Las bibliotecas de anticuerpo usadas en este método pueden ser bibliotecas de scFv se preparan y analizan como se describe en WO 92/01047, McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); y Griffiths et al., EMBO J. 12:725-734 (1993). Las bibliotecas de anticuerpo scFv ase pueden analizar usando CCR2 humano como el antígeno.

[0100] Una vez que se seleccionan las regiones iniciales de $V_L$ y $V_H$ humanas, se realizan experimentos de "mezclar y aparear", en los que se analizan diferentes pares de los segmentos $V_L$ y $V_H$ inicialmente seleccionados se analizan para determinar la unión de OX40R para seleccionar las combinaciones de pares $V_L/V_H$. En forma adicional, para mejorar adicionalmente la calidad del anticuerpo, los segmentos de $V_L$ y $V_H$ de los pares $V_L/V_H$ se pueden mutar en forma aleatoria, dentro de la región CDR3 de $V_H$ y/o $V_L$, en un proceso análogo al proceso de mutación somática in vivo responsable de la maduración de afinidad de los anticuerpos durante una respuesta inmune natural. Esta maduración de afinidad in vitro se puede obtener por la amplificación de los dominios $V_H$ y $V_L$ usando cebadores de PCR complementarios con la $V_H$ de CDR3 o $V_L$ de CDR3, respectivamente, dichos cebadores han sido "reforzados" con una mezcla aleatoria de las cuatro bases de nucleótidos en determinadas posiciones de modo que los productos de PCR resultantes codifican segmentos de $V_H$ y $V_L$ en el que se han introducido mutaciones al azar en las regiones $V_H$ y/o $V_L$ de CDR3. Estos segmentos de $V_H$ y $V_L$ mutados al azar se pueden analizar nuevamente para determinar la unión a OX40R.

[0101] Después de la detección y el aislamiento de un anticuerpo de OX40R o porción de unión al antígeno de una

biblioteca de despliegue de inmunoglobulina recombinante, los ácidos nucleicos que codifican la molécula de unión se pueden recuperar del paquete de despliegue (por ejemplo, del genoma del fago) y subclonar en otros vectores de expresión por técnicas de ADN recombinante. Si se desea, el ácido nucleico se puede manipular adicionalmente para crear otras formas de anticuerpo, como se describe a continuación. Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado por la selección de una biblioteca combinatoria, el ADN que codifica el anticuerpo se clona en un vector de expresión recombinante y se introduce en células huésped de mamífero, como se describió anteriormente.

146

[0102] **Composiciones farmacéuticas**

[0103] En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene una o una combinación de moléculas de unión provistas por la descripción, y opcionalmente un vehículo aceptable para uso farmacéutico. Las composiciones se pueden preparar por métodos convencionales conocidos en el arte.

[0104] En algunas realizaciones, la composición comprende un anticuerpo de OX40R o uno de sus fragmentos de unión al antígeno. En una realización particular, la composición comprende el anticuerpo 11D4 o el anticuerpo 18D8, o un fragmento de unión al anticuerpo de cualquier anticuerpo. En otras realizaciones más, la composición comprende un derivado del anticuerpo 11D4 o anticuerpo 18D8.

[0105] El término "vehículo aceptable para uso farmacéutico" se refiere a cualquier sustancia inactiva que es adecuada para usar en una formulación para la administración de una molécula de unión. Un vehículo

puede ser un antiadherente, aglutinante, cubierta, desintegrante, relleno o diluyente, conservante (tales como un agente antioxidante, antibacteriano o antifúngico), edulcorante, agente de retraso de absorción, agente humectante, agente emulsionante, buffer, y similares. Los ejemplos de vehículos aceptables para uso farmacéutico adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares) dextrosa, aceites vegetales (tales como aceite de oliva), solución salina, buffer, solución salina bufferizada y agentes isotónicos tales como azúcares, polialcoholes, sorbitol, y cloruro de sodio.

[0106] Las composiciones pueden estar en cualquier forma adecuada, tales como formas líquida, semisólida, y sólida. Los ejemplos de formas de dosis líquidas incluyen solución (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), microemulsión, liposoma, dispersión o suspensión. Los ejemplos de formas de dosis sólidas incluyen comprimidos, pastillas, cápsulas, microcápsulas y polvo. Una forma particular de la composición adecuada para administrar una molécula de unión es un líquido estéril, tal como una solución, suspensión, o dispersión, para inyección o infusión. Las soluciones estériles se pueden preparar por la incorporación del anticuerpo en la cantidad requerida en un vehículo apropiado, seguido por la esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparar por la incorporación del anticuerpo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y otros vehículos. En el caso de polvos estériles para la preparación de líquidos estériles, los métodos de preparación incluyen secado al vacío y secado-congelación (liofilización) para producir

un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una de sus soluciones previamente filtrada estéril. Las varias formas de dosis de las composiciones se pueden preparar por técnicas convencionales conocidas en el arte.

148

[0107] La cantidad relativa de una molécula de unión incluida en la composición variará de acuerdo con numerosos factores, tales como la molécula de unión y los vehículos específicos usados, forma de dosis y liberación deseadas y características farmacodinámicas. La cantidad de una molécula de unión en una forma de dosis única generalmente será la cantidad que produce un efecto terapéutico, pero también puede ser una cantidad menor. Generalmente, esta cantidad variará de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente 99 por ciento, de aproximadamente 0,1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, o de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento respecto al peso total de la forma de dosis.

[0108] Además de la molécula de unión, se pueden incluir uno o más agentes terapéuticos adicionales en la composición. Los ejemplos de los agente terapéuticos adicionales se describen en la presente a continuación. La cantidad adecuada del agente terapéutico adicional incluido en la composición puede ser seleccionado fácilmente por los expertos en el arte y variará de acuerdo con numerosos factores, tales como el agente y los vehículos particulares usados, forma de dosis y liberación deseadas y características farmacodinámicas. La cantidad del agente terapéutico adicional en una forma de dosis única generalmente será la cantidad del agente que produce un efecto terapéutico, pero también puede ser una cantidad menor.

[0109] **Uso de las moléculas de unión y las composiciones farmacéuticas**

[0110] Las moléculas de unión y las composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de unión provista por la presente descripción son útiles para fines terapéuticos, diagnósticos, u otros, tales como aumentar una respuesta inmune, tratar cáncer, aumentar la eficacia de otra terapia del cáncer o aumentar la eficacia de la vacuna, y tener diversas utilidades, tales como para uso como medicamentos o agentes de diagnóstico. En consecuencia, en otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos de usar las moléculas de unión o composición farmacéuticas.

149

[0111] En un aspecto particular, se proporcionan métodos para mejorar la respuesta inmune en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de unión provista por la descripción. En algunas realizaciones, la molécula de unión es un anticuerpo de OX40R o su fragmento de unión al anticuerpo y el mamífero es un ser humano. En una realización adicional, la molécula de unión es el anticuerpo 11D4 o anticuerpo 18D8, o un fragmento de unión al anticuerpo de cualquier anticuerpo. El término "mejorar la respuesta inmune" o sus variaciones gramaticales, significa estimular, provocar, aumentar, mejorar o incrementar cualquier respuesta del sistema inmune de un mamífero. La respuesta inmune puede ser una respuesta celular (es decir, mediada por células, tales como mediada por linfocitos T citotóxicos) o una respuesta humoral (es decir, respuesta mediada por anticuerpo), y puede ser una respuesta inmune primaria o secundaria. Los ejemplos de mejora de la respuesta inmune incluyen actividad de células T auxiliares CD4+ y la

generación de células T citolíticas. La mejora de la respuesta inmune se puede evaluar usando numerosas mediciones in vitro o in vivo conocidas por los expertos en el arte, que incluyen, pero sin limitación, ensayos de linfocitos T citotóxicos, liberación de citoquinas (por ejemplo producción de IL-2), regresión de tumores, supervivencia de animales portadores de tumor, producción de anticuerpo, proliferación de células, expresión de marcadores de superficie celular y citotoxicidad. Normalmente, los métodos de esta descripción aumentan la respuesta inmune de un mamífero cuando se comparar con la respuesta inmune de un animal no tratado o un animal no tratado usando los métodos reivindicados. En una realización, el método aumenta una respuesta inmune celular, particularmente una respuesta de células T citotóxicas. En otra realización, la respuesta inmune celular es respuesta las células T auxiliares. En otra realización más, la respuesta inmune es una producción de citoquinas, en particular producción de IL-2.

150

[0112] En otro aspecto particular, la presente descripción proporciona un método de tratar cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de unión provista por la descripción. El término "tratar cáncer" o "tratamiento del cáncer" se refiere a causar un efecto beneficioso o deseable en un mamífero diagnosticado con un cáncer. El efecto beneficioso o deseable puede incluir la inhibición de crecimiento o desarrollo adicional de células cancerosas, muerte de células cancerosas, inhibición de la reaparición del cáncer, reducción de dolor asociado con el cáncer o aumento de la supervivencia del animal. La inhibición de la reaparición del cáncer contempla sitios de cáncer y

tejido circundante que ha sido tratado previamente con radiación, quimioterapia u otras técnicas. El efecto puede ser subjetivo u objetivo. Por ejemplo, si el animal es el ser humano, el ser humano puede advertir aumento de vigor o vitalidad o disminución de dolor como síntomas subjetivos de aumento o mejora de la respuesta a la terapia. En forma alternativa, el médico puede notar una reducción del tamaño del tumor o masa de tumor basado en un examen físico, parámetros de laboratorio, hallazgos radiográficos de marcadores tumorales. Algunos signos de laboratorio que el médico puede observar como respuesta al tratamiento incluye la normalización de las pruebas, tales como recuentos de leucocitos, recuento de eritorcitos, recuento de plaquetas, velocidad de sedimentación eritrocitaria y varios niveles de enzimas. En forma adicional, el médico puede observar una reducción del marcador tumoral detectable. Alternativamente, se pueden usar otras pruebas para evaluar la mejora objetiva, tales como ecografías, pruebas de resonancia magnética nuclear y pruebas emisión de positrones. En algunas realizaciones, la molécula de unión es un anticuerpo de OX40R o uno de sus fragmentos de unión al antígeno provista por la descripción. En una realización adicional la molécula de unión es anticuerpo 11D4 o 18D8, o un fragmento de unión al anticuerpo de cualquier anticuerpo. En una realización adicional, el mamífero es un ser humano.

[0113] En otro aspecto particular, la presente descripción proporciona un método de prevención de cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de unión provista por la descripción. El término "prevenir cáncer" o "prevención del cáncer" se refiere a retrasar,

inhibir o impedir el comienzo de un cáncer en un mamífero en el que el comienzo de la oncogénesis o tumorigénesis no se evidencia pero se identifica una predisposición para el cáncer sea determinado por análisis genético, por ejemplo, o de otro modo. El término también abarca tratar un mamífero que padece patologías premalignas para detener la progresión o provocar la regresión de las patologías premalignas hacia la neoplasia. Los ejemplos de patologías premalignas incluyen hiperplasia, displasia, y metaplasia. En algunas realizaciones, la molécula de unión es un anticuerpo de OX40R o uno de sus fragmentos provistos por la descripción. En una realización adicional la molécula de unión es anticuerpo 11D4 o 18D8, o un fragmento de unión al anticuerpo de cualquier anticuerpo. En una realización adicional, el mamífero es un ser humano.

[0114] Una variedad de cánceres, sean malignos o benignos y primarios o secundarios se pueden tratar o prevenir con un método provisto por la descripción. Los ejemplos de dichos cánceres incluyen cánceres de pulmón tales como carcinoma broncogénico (por ejemplo, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células pequeñas, carcinoma de células grandes y adenocarcinoma), carcinoma de células alveolares, adenoma bronquial, amartoma condromatoso (no canceroso), y sarcoma (canceroso); cáncer de corazón tal como mixoma, fibromas, y rhabdomiomas; cánceres de hueso tales como osteocondromas, condromas, condroblastomas, fibromas condromixoides, osteomas osteoides, tumores de células gigantes, condrosarcoma, mieloma múltiple, osteosarcoma, fibrosarcomas, histiocitomas fibrosos malignos, tumor de Ewing (sarcoma de Ewing), y sarcoma de células del retículo; cáncer cerebral como gliomas (por ejemplo, glioblastoma multiforme), astrocitomas

anaplásicos, astrocitomas, oligodendrogliomas, meduloblastomas, cordoma, Schwannomas, ependimomas, meningiomas, adenoma hipofisario, pinealoma, osteomas, hemangioblastomas, craniofaringomas, cordomas, germinomas, teratomas, quistes dermoides y angiomas; cánceres del sistema digestivo tales como leiomioma, carcinoma epidermoide, adenocarcinoma, leiomiosarcoma, adenocarcinomas de estómago, lipomas intestinales, neurofibromas intestinales, fibromas intestinales, pólipos de intestino grueso, y cánceres colorrectales; cánceres hepáticos tales como adenomas hepatocelulares, hemangioma, carcinoma hepatocelular, carcinoma fibrolamelar, colangiocarcinoma, hepatoblastoma, y angiosarcoma; cánceres de riñón tales como adenocarcinoma renal, carcinoma de células renales, hipernefroma y carcinoma de células de transición de la pelvis renal; cánceres de vejiga; cánceres hematológicos tales como leucemia linfocítica aguda (linfoblástica), leucemia mieloide aguda (mielocítica, mielógena, mieloblástica, mielomonocítica), leucemia linfocítica crónica (por ejemplo, síndrome de Sezary y leucemia de células pilosas), leucemia mielocítica crónica (mieloide, mielógena, granulocítica), linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células B, micosis fungoides, y trastornos mieloproliferativos (que incluyen trastornos mieloproliferativos tales como policitemia vera, mielofibrosis, trombocitemia y leucemia mielocítica crónica); cánceres de piel tales como carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, melanoma, sarcoma de Kaposi y enfermedad de Paget; cánceres de cabeza y cuello; cánceres relacionados con el ojo tales como retinoblastoma y melanocarcinoma intraocular; cánceres del sistema reproductor masculino

tales como hiperplasia prostática benigna, cáncer de próstata y cánceres testiculares (por ejemplo, seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, y coriocarcinoma); cánceres de mamas; cánceres del sistema reproductor femenino tales como cáncer uterino (carcinoma de endometrio), cáncer cervical (carcinoma cervical), cáncer de los ovarios (carcinoma ovárico), carcinoma vulvar, carcinoma vaginal, cáncer de trompas de Falopio y mola hidatidiforme; cáncer tiroideo (que incluye cáncer capilar, folicular, anaplásico o medular); feocromocitomas (glándula adrenal); crecimientos no cancerosos de las glándulas paratiroides; cánceres pancreáticos; y cánceres hematológicos tales como leucemias, mielomas, linfomas no Hodgkin y linfomas de Hodgkin.

154

[0115] Para practicar los métodos terapéuticos, las moléculas de unión se pueden administrar solo como monoterapia o administrar en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales o terapias. En consecuencia, en otro aspecto, la presente descripción proporciona una terapia combinada, que comprende una molécula de unión provista por la descripción en combinación con una o más terapias o agentes terapéuticos adicionales. El término "terapia adicional" se refiere a una terapia que no emplea una molécula de unión provista por la descripción as a agente terapéutico. El término "agente terapéutico adicional" se refiere a cualquier agente terapéutico diferente de una molécula de unión provista por la descripción. En algunas realizaciones, la molécula de unión es el anticuerpo 11D4 o 18D8, o un fragmento de unión al anticuerpo de cualquier anticuerpo. En un aspecto particular, la presente descripción proporciona una terapia de combinación para tratar cáncer

en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de unión provista por la descripción en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En una realización adicional, el mamífero es un ser humano.

[0116] Una amplia variedad de agentes terapéuticos para el cáncer se pueden usar en combinación con una molécula de unión. Los expertos en el arte reconocerán la presencia y el desarrollo de otras terapias del cáncer que se pueden usar en combinación con los métodos y las moléculas de unión de la presente descripción, y no estarán restringidos a las formas de terapia expuestas en la presente. Los ejemplos de categorías de agentes terapéuticos adicionales que se pueden usar en la terapia de combinación para tratar cáncer incluyen (1) agentes quimioterapéuticos, (2) agentes inmunoterapéuticos, y (3) agentes terapéuticos hormonales.

[0117] El término "agente quimioterapéutico" se refiere a sustancias químicas o biológicas que pueden causar la muerte de las células cancerosas, o interferir en el crecimiento, división, reparación y/o función de las células cancerosas. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen los que se describen en WO 2006/088639, WO 2006/129163, y US 20060153808, cuyas descripciones se incorporan en la presente como referencia. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos particular incluyen: (1) agentes alquilantes, tales como clorambucilo (LEUKERAN), ciclofosfamida (CYTOXAN), ifosfamida (IFEX), clorhidrato de mecloretamina (MUSTARGEN), tiotepa (THIOPLEX), estreptozotocina (ZANOSAR), carmustina (BICNU, GLIADEL WAFER), lomustina (CEENU), y dacarbazina (DTIC-DOME); (2) alcaloides o alcaloides de vinca vegetales, que incluyen antibióticos

citotóxicos, tales como doxorrubicina (ADRIAMYCIN), epirrubicina (ELLENCE, PHARMORUBICIN), daunorrubicina (CERUBIDINE, DAUNOXOME), nemorrubicina, idarrubicina (IDAMYCIN PFS, ZAVEDOS), mitoxantrona (DHAD, NOVANTRONE), dactinomicina (actinomicina D, COSMEGEN), plicamicina (MITHRACIN), mitomicina (MUTAMICINA), y bleomicina (BLENOXANE), tartrato de vinorelbina (NAVELBINE)), vinblastina (VELBAN), vincristina (ONCOVIN), y vindesina (ELDISINE); (3) antimetabolitos, tales como capecitabina (XELODA), citarabina (CYTOSAR-U), fludarabina (FLUDARA), gemcitabina (GEMZAR), hidroxiurea (HYDRA), metotrexato (FOLEX, MEXATE, TREXALL), nelarabina (ARRANON), trimetrexato (NEUTREXIN), y pemetrexed (ALIMTA); (4) antagonistas de pirimidina, tales como 5-fluorouracilo (5-FU); capecitabina (XELODA), raltitrexed (TOMUDEX), tegafur-uracilo (UFTORAL), y gemcitabina (GEMZAR); (5) taxanos, tales como docetaxel (TAXOTERE), paclitaxel (TAXOL); (6) fármacos de platino, tales como cisplatino (PLATINOL) y carboplatino (PARAPLATIN), y oxaliplatino (ELOXATIN); (7) inhibidores de topoisomerasa, tales como irinotecano (CAMPTOSAR), topotecano (HYCAMTIN), etopósido (ETOPOPHOS, VEPESSID, TOPOSAR), y tenipósido (VUMON); (8) epipodofilotoxinas (derivados de podofilotoxina), tales como etopósido (ETOPOPHOS, VEPESSID, TOPOSAR); (9) derivados de ácido fólico, tales como leucovorina (WELLCOVORIN); (10) nitrosoureas, tales como carmustina (BiCNU), lomustina (CeeNU); (11) inhibidores del receptor de tirosina quinasa, que incluyen receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento tipo insulina (IGFR), receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR), y receptor del factor de crecimiento

derivado de plaquetas (PDGFR), tales como gefitinib (IRESSA), erlotinib (TARCEVA), bortezomib (VELCADE), mesilato de imatinib (GLEEVEC), genefitinib, lapatinib, sorafenib, talidomida, sunitinib (SUTENT), axitinib, rituximab, trastuzumab (HERCEPTIN), cetuximab (ERBITUX), bevacizumab (AVASTIN), y ranibizumab (LUCENTIS), lym-1 (ONCOLYM), anticuerpos para el receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1R) que se describen en WO2002/053596); (12) inhibidores de angiogénesis, tales como bevacizumab (AVASTIN), suramina (GERMANIN), angiostatina, SU5416, talidomida, e inhibidores de la metaloproteinasa de matriz (tales como batimastat y marimastat), y los que se describen en WO2002055106; y (13) inhibidores de proteasoma, tales como bortezomib (VELCADE).

[0118] El término "agentes inmunoterapéuticos" se refiere sustancias químicas o biológicas que pueden mejorara la respuesta inmune de un mamífero. Los ejemplos de agentes inmunoterapéuticos incluyen: bacilo Calmette-Guerin (BCG); citoquinas tales como interferones; vacunas tales como inmunoterapia personalizada con MyVax, Onyvax-P, Oncophage, GRNVAC1, FavId, Provenge, GVAX, Lovaxin C, BiovaxID, GMXX, y NeuVax; y anticuerpos tales como alemtuzumab (CAMPATH), bevacizumab (AVASTIN), cetuximab (ERBITUX), gemtuzunab ozogamicin (MYLOTARG), ibritumomab tiuxetan (ZEVALIN), panitumumab (VECTIBIX), rituximab (RITUXAN, MABTHERA), trastuzumab (HERCEPTIN), tositumomab (BEXXAR), tremelimumab, CAT-3888, y los anticuerpos agonistas del receptor de CD40 que se describen en WO2003/040170.

[0119] El término "agente terapéutico hormonal" se refiere a sustancias químicas o biológicas que inhiben o eliminan la producción de una hormona o inhibe o

contrarresta el efecto de una hormona sobre el crecimiento y/o supervivencia de las células cancerosas. Los ejemplos de dichos agentes adecuados para los métodos de la presente incluyen los que se describen en US20070117809. Los ejemplos de agentes terapéuticos hormonales particulares incluyen tamoxifeno (NOLVADEX), torremifeno (Fareston), fulvestrant (FASLODEX), anastrozol (ARIMIDEX), exemestano (AROMASIN), letrozol (FEMARA), acetato de megestrol (MEGACE), goserelina (ZOLADEX), y leuprolida (LUPRON). Las moléculas de unión de esta descripción también se pueden usar en combinación con terapias hormonales no farmacológica tales como (1) métodos quirúrgicos que extirpan el total o parte de los órganos o glándulas que participan en la producción de la hormona, tales como los ovarios, los testículos, la glándula adrenal y la glándula hipofisaria y (2) tratamiento con radiación, en la que los órganos o glándulas del paciente se someten a radiación en una cantidad suficiente para inhibir o eliminar la producción de la hormona específica.

[0120] La terapia de combinación para tratar cáncer también abarca la combinación de una molécula de unión provista por la descripción con cirugía para extirpar un tumor. La molécula de unión se puede administrar al mamífero antes, durante o después de la cirugía.

[0121] La terapia de combinación para tratar cáncer también abarca la combinación de una molécula de unión provista por la descripción con terapia por radiación, tales como radioterapia ionizante (electromagnética) (por ejemplo, rayos X o rayos gammas) y terapia de radiación con rayo de partículas (por ejemplo, radiación de alta energía lineal). La fuente de radiación puede ser externa o interna al mamífero. La molécula de unión se puede

administrar al mamífero antes, durante o después de la terapia de radiación.

[0122] **Administración de las moléculas de unión y las composiciones**

[0123] Las moléculas de unión y las composiciones provistas por la presente descripción se pueden administrar por cualquier vía enteral o parenteral de administración. El término "vía enteral" de administración se refiere a la administración por medio de cualquier parte del aparato gastrointestinal. Los ejemplos de vías enterales incluyen vía oral, mucosa, bucal, y rectal, o vía intragástrica. La "vía parenteral" de administración se refiere a una vía de administración diferente de la vía enteral. Los ejemplos de vías parenterales de administración incluyen administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intratumoral, intravesical, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, transtraqueal, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intrasternal, subcutánea o tópica. Los anticuerpos y las composiciones de la descripción se pueden administrar por cualquier método adecuado, tal como por ingestión oral, tubo nasogástrico, tubo de gastrostomía, inyección, infusión, bomba de infusión implantable y bomba osmótica. La vía y el método de administración adecuados pueden variar de acuerdo con numerosos factores tales como el anticuerpo especifico usado, la tasa de absorción deseada, la formulación o forma de dosis específicas usadas, tipo y gravedad del trastorno tratado, el sitio específico de acción, y condiciones del paciente y pueden ser seleccionados fácilmente por los expertos en el arte

[0124] El término "cantidad terapéuticamente efectiva" de una molécula de unión se refiere a una cantidad que es efectiva para un fin terapéutico deseado. Por ejemplo, en el contexto de la mejora de una respuesta inmune, una "cantidad terapéuticamente efectiva" es cualquier cantidad que es efectiva para estimular, provocar, aumentar, mejorar o incrementar cualquier respuesta del sistema inmune del mamífero. En el contexto de tratar el cáncer, una "cantidad terapéuticamente efectiva" es cualquier cantidad que es suficiente para causar algún efecto beneficioso o deseable en el mamífero tratado, tal como inhibición de crecimiento o desarrollo adicionales de las células cancerosas, muerte de células cancerosas, inhibición de la reaparición del cáncer, reducción del dolor asociado con el cáncer, o mejorar la supervivencia del mamífero. En un método para prevenir el cáncer, una "cantidad terapéuticamente efectiva" es cualquier cantidad que es efectiva para retrasar, inhibir o prevenir el comienzo del cáncer en el mamífero en el que se administra la molécula de unión. La cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de unión usualmente varía de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 500 mg/kg, y más usualmente aproximadamente 0,05 a aproximadamente 100 mg/kg del peso corporal del mamífero. Por ejemplo, la cantidad puede ser aproximadamente 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 50 mg/kg, o 100 mg/kg del peso corporal del mamífero. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de OX40R está en el rango de aproximadamente 0,1-30 mg/kg del peso corporal del mamífero. El nivel de dosis exacto que será administrado puede ser determinado con facilidad por los expertos en el arte y dependerá de varios factores, tales

como el tipo y gravedad del trastorno tratado, la molécula de unión particular empleada, la vía de administración, el tiempo de administración, la duración del tratamiento, la terapia adicional particular empleada, la edad, el sexo, peso, condición, salud general y antecedentes médicos previos del paciente tratado y factores similares bien conocidos en las artes médicas.

[0125] Una molécula de unión o composición se administra usualmente en múltiples ocasiones. Los intervalo entre las dosis únicas pueden ser, por ejemplo, semanal, mensual, cada tres meses o anual. Un ejemplo de régimen de tratamiento supone la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez por mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Los regimenes de dosis típicos para un anticuerpo de OX40R incluye 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal por administración intravenosa, usando uno de los siguientes esquemas: (i) cada cuatro semanas para seis dosis, luego cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido por 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

**EJEMPLOS**

**Ejemplo 1: Preparación de anticuerpos OX40R**

[0126] Los anticuerpos ilustrativos de acuerdo con la descripción se prepararon, seleccionaron y analizaron de la siguiente manera:

[0127] **Inmunización con el antígeno OX40R y selección de ratones productores de anticuerpos monoclonales OX40R:**

[0128] Los anticuerpos monoclonales completamente humanos

para OX40R humano se prepararon mediante cepas de ratón transgénico Ig humana HCo7, HCo 12, Hco 17, y Hco27 así como cepas transcromosómicas/transgénicas humanas, KM (Medarex, Inc.). Todas estas cepas expresan anticuerpos completamente humanos que son indistinguibles de los anticuerpos aislados de seres humanos.

[0129] En las cepas transgénicas, tanto el gen de la cadena liviana kappa endógena de ratón como el gen de la cadena pesada kappa endógena de ratón se alteraron en forma homocigoto como se describe en Chen et al. (1993) EMBO J. 12:821-830 y en el Ejemplo 1 de WO 01/09187, respectivamente. Más aún, estos portan un transgén de la cadena liviana kappa humana, KCo5, descripta en Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851. En contraste, las cepas transgénicas son distintas con respecto a los genes de la cadena pesada humana. La cepa HCo7 porta el transgén de la cadena pesada humana HCo7 como se describe en las Patentes estadounidenses Nos.: 5.545.806, 5.625.825, y 5.545.807; la cepa HCo12 porta el transgén de la cadena pesada humana HCo12 como se describe en Ejemplo 2 de WO01/09187; la cepa Hco17 porta el transgén de la cadena pesada humana Hco17 como se describe en el Ejemplo 8 de Deshpande et al., US 2005/0191293A1; la cepa Hco27 porta el transgén de la cadena pesada humana Hco27 como se describe en el Ejemplo 5 de PCT/US2008/072640 presentado el 08 de agosto de 2008. La cepa KM porta un minicromosoma humano como se describe en Ishida et al., (2002), Cloning and Stem Cells, 4: 91-102.

[0130] Los esquemas generales de inmunización para los ratones HuMab se describen en Lonberg et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851; y Publicación de PCT WO

98/24884.

[0131] Los ratones HuMab de las cepas HCo7, HCo12, Hco 17, Hco27 y KM se inmunizaron comenzando a las 6-16 semanas con 15-25 µgs de proteína OX40R-Ig recombinante humana y línea de las célula pre-B murinas, 300-19 (Reth, M. G. et al., Nature 312 29: 418-42, 1984; Alt, F. et al., Cell 27: 381-390, 1981), se transfectaron para expresar el OX40R humano en adyuvante Ribi. La proteína OX40R-Ig recombinante humana purificada es una construcción del dominio extracelular (aminoácidos 1-220) del OX40R humano fusionados a la región constante de la IgG1 humana. La administración fue por medio de inyección intraperitoneal, subcutánea o en la pata trasera con intervalos 3-28 días, hasta un total de 10 immunizaciones. La respuesta inmune se controló por análisis ELISA y FACS como se describe a continuación.

[0132] **Selección de ratones HuMab productores de anticuerpos OX40R:**

[0133] Para seleccionar ratones HuMab productores de anticuerpos que se unen al OX40R, se obtuvo sangre de los ratones inmunizados y se analizó por ELISA para determinar unión específica a la proteína de OX40R recombinante humana purificada, y por FACS para determinar la unión a una línea celular que expresa el OX40R humano de longitud completa, y no una línea control que no expresa OX40R.

[0134] El ensayo de unión ELISA fue como se describe en Fishwild et al. (1996), Nature Biotechnology 14: 845-851. En breves palabras, las placas de microtitulación se cubrieron usando 50 µl/pocillo de una solución OX40R-Ig recombinante purificada que contiene 1 µg/ml en PBS, y se incubó toda la noche a 4 °C. Los pocillos luego se

bloquearon usando 200 µl/pocillo de 5% de suero de pollo en PBS/Tween (0,05%). Las diluciones de plasma de los ratones inmunizados con OX40R-se agregaron a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y luego se incubaron con anticuerpo policlonal IgG Fc humana anticabra conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, las placas se desarrollaron con sustrato ABTS (Moss Inc., producto #: ABTS-1000 mg/ml) y se analizaron por espectrofotómetro a una DO de 405.

[0135] El ensayo FACS se llevó a cabo de acuerdo con procedimientos convencionales. En breves palabras, las células 300-19 que expresan OX40R se incubaron con suero de ratones inmunizados diluido a 1:20. Las células se lavaron y se detectó la unión al anticuerpo específico con IgG Ab antihumana marcada con FITC. Se realizaron análisis de citometría de flujo en un instrumento de flujo FACS (Becton Dickinson, San Jose, CA).

[0136] Los ratones que desarrollaron los títulos más altos de anticuerpos de OX40R se usaron para las fusiones. Las fusiones se realizaron como se describe a continuación y se analizaron los sobrenadantes del hibridoma para determinar la actividad anti-OX40R por ELISA y FACS.

[0137] **Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos para OX40R:**

[0138] A los ratones seleccionados anteriormente se les administró un refuerzo por vía intravenosa con OX40R-Ig 3 días y luego otra vez a los 2 días antes del sacrificio y extirpación del bazo y/o ganglios linfáticos.

[0139] Los esplenocitos y/o linfocitos del ganglio

linfático de los ratones HuMab o KM inmunizados se fusionaron a células de mieloma no secretor de ratón SP2/0 (ATCC, CRL-1581) usando electrofusión (E-fusion, tecnología Cyto Pulse™, Cyto Pulse™ Sciences, Inc., Glen Burnie, MD), de acuerdo con protocolos estándares o recomendados por el fabricante. En breves palabras, se prepararon suspensiones celulares únicas de esplenocitos y/o linfocitos del ganglio linfático del ratón inmunizado y luego se combinaron con una cantidad igual de células de mieloma no secretor de ratón SP2/0; luego se realizó E-fusión.

[0140] Luego las células se sembraron a razón de $2x10^4$ células/pocillo en una placa de extremo inferior plano, y se incubaron durante 10-14 días en medio selectivo que contiene 10% de suero fetal bovino, 10% de medio acondicionado P388D1 (ATCC, CRL-TIB-63), 3-5% de (IGEN) en DMEM (Mediatech, Herndon, VA, Cat. No. CRL 10013, con alta glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio), 7 mM de HEPES, 0,055 mM de 2-mercaptoetanol, 0,1 IU/mL de penicilina - 0,1 mg/mL de estreptomicina y 1x HAT (Sigma, Cat. No. CRL -P-7185).

[0141] Después de 1-2 semanas, las células se cultivaron en el medio en que se reemplazó HAT con HT. Aproximadamente 10-14 días después de la siembra de células, se analizaron los sobrenadantes de los pocillos individuales para determinar la presencia de anticuerpos kappa de gamma humana. Los sobrenadantes clasificados como positivos para kappa de gamma humana luego se analizaron por ELISA y FACS (usando el protozoo descripto anteriormente) para anticuerpos IgG monoclonales de OX40R humano. Los hibridomas secretores de anticuerpo se transfirieron a placas de 24 pocillos, se analizaron nuevamente y, si se confirmó que eran positivos para

anticuerpos monoclonales IgG de OX40R humano, se subclonaron al menos dos veces con dilución limitante. Posteriormente los subclones estables se cultivaron in vitro para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo de tejido para la caracterización adicional.

**EJEMPLO 2: EJEMPLOS BIOLÓGICOS/FARMACOLÓGICOS**

[0142] A. Procedimientos del estudio in vitro:

[0143] Unión del dominio extracelular del OX40R: Una proteína de fusión OX40-Ig humana se diluyó en buffer carbonato BupH™, pH 9,4 (Pierce, Rockford, IL) se cubrió en placas Maxisorb de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Denmark) a razón de 100 µl/pocillo (0,25 µg/ml) y se incubó toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con buffer de lavado que contiene 0,05% de Tween 20 (Sigma, St Louis, MO) diluido en n PBS (Sigma, St Louis, MO) y se bloqueó con 300 µl/pocillo de 0,5% de BSA (Sigma, St Louis, MO) en PBS durante 1 hora a RT°. Después, las placas se lavaron y se incubaron con anticuerpos OX40 anti-humanos reactivos diluido en buffer de bloqueo en varias concentraciones (100 µl/pocillo) y se incubó durante 1 hora a RT°. Luego las placas se lavaron y se incubaron durante una hora a RT° con anticuerpo de cadena kappa antihumana marcada con peroxidasa de rábano (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) a 25 ng/ml en buffer de bloqueo. Finalmente, las placas de ensayo se lavaron y se agregaron 100 µl/pocillo de sustrato 1-Step Turbo-™ (Pierce, Rockford, IL) durante 30 minutos a RT°. La reacción se detuvo por agregado de un volumen igual de $H_2SO_4$ 2M y se leyó la absorbancia a 450 nm en Molecular Devices Spectra Max 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

[0144] Unión a OX40R de la superficie celular sobe la base de FACS: Se usaron líneas celulares que expresan OX40R (ver más adelante) o células mononucleares de sangre periférica primaria activadas (ver más adelante) para evaluar la unión en recetores de OX40 humanos y de cynomolgus. Las células se recolectaron y lavaron (5 x $10^5$/tubo) usando buffer de lavado a RT°. El buffer de lavado consistía en PBS, 2% de suero bovino fetal inactivado por calor (Hyclone, Logan, UT) y 0,02% de azida sódica (Sigma, St. Louis, MO). Después, 100 µl de varias concentraciones de anticuerpo se agregaron a las células (a partir de 30 ug/ml y usando una titulación de 3 veces) diluido en buffer de lavado que contiene 0,005 mg/ml de citocolasina B (Sigma, St. Louis, MO). Las células se agitaron suavemente a RT° durante 3 horas. Posteriormente, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 0,5 ml/tubo con buffer de lavado frío y se recolectaron y analizaron 10.000 eventos usando un Becton Dickinson FACSCalibur y un programa de computación CellQuest (San Jose, CA).

[0145] Ensayo Biacore: El instrumento de análisis de interacción bioespecífica biosensor (BlAcore 2000) usa la resonancia de plamón superficial para medir las interacciones moleculares en chip sensor CM5. Se miden los cambios de los índices de refracción entre dos medios, vidrio y dextrano carboximetilado, causado por la interacción de las moléculas del lado de dextrano del chip sensor y se informan como cambios de unidades de reflectancia arbitraria (RU) como se detalla en las indicaciones de aplicación del fabricante.

[0146] Las superficies de dextrano carboximetilado de un chip sensor CM5 se activaron por derivatización con 0,05 M de N-hidroxisuccinimida mediado por 0,2 M de N-etil-N'-

(dimetilaminopropil)carbodiimida durante 7 min. Se inyectó estreptavidina (Sigma S-4762) a una concentración de 500 µg/ml, en acetato de Na 10 mM, pH 4,5, en tres superficies (celda de flujo 2, 3 y 4) a una velocidad de 5 µl/min y se inmovilizó en forma covalente en las superficies de la celda de flujo con aproximadamente 2500 RU. Se inyectaron 35 µl de buffer de acetato de Na 10 mM en una celda de flujo 1 durante la inmovilización en el lugar del antígeno para obtener una superficie blanco activada para medir la unión no específica. La desactivación de ésteres de N-hidroxisuccinimida sin reaccionar en las cuatro celdas de flujo se realizó usando clorhidrato de etanolamina 1 M, pH 8,5. Después de la inmovilización, las celdas de flujo se limpian de cualquier material sin reaccionar o poco unido con 5 inyecciones de regeneración de 5 µl de NaOH 50 mM hasta obtener un valor basal estable.

[0147] Se inyectó en forma manual CD134-muIg biotinilado (Ancell 513-030), a una concentración de 10 µg/ml con una velocidad de flujo de 5 µl/min en las celdas de flujo 2, 3 y 4 para obtener 3 densidades de superficie: Fc-2=150RU, Fc-3=375RU y Fc-4=580RU. Se prepararon superficies de densidad diferente para controlar la posibilidad de unión limitada por transporte de masa durante la fase de asociación y la reunión durante la disociación, se deben evitar ambos artefactos, que están influidos por la densidad de superficie.

[0148] Se prepararon diluciones seriadas de los anticuerpos de OX40R respecto de un rango de concentración de 666 nM a 66 pM en semilog en buffer de corrida (0,01 M de HEPES, pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,005% de polisorbato 20 (v/v)). La velocidad de flujo se ajustó a 5 µl/min y 25 µl de cada muestra de

punto de concentración se inyectó en el chip sensor con una inyección de regeneración de 5 µl de 50 mM de NaOH entre cada concentración de anticuerpo inyectado. El tiempo de disociación fue 5 min. Los datos se analizaron usando el programa de computación de ajuste global BIAevaluation 3.0 (análisis separado de cada punto de concentración)

[0149] Caracterización de epitope: Se usaron células 300-19 que expresan una construcción de fusión de OX40-CD40 recombinante humana que corresponde a una secuencia de 1-235 aminoácidos de OX40 (dominio extracelular y transmembrana) y secuencia de aminoácidos 216-278 de CD40 (dominio intracelular) para el análisis de epitope de anticuerpo. La línea celular que expresa OX40-CD40 se cultivó en medio RPMI (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero de ternero fetal (Hyclone, Logan, UT), 10 mM de hepes, 1% de penicilina-estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales y 0,05 mM de 2-mercaptoetanol (Gibco, Grand Island, NY). Las células 300-19.hCD134.2 ($5x10^5$/tubo) se lavaron una vez en 3 ml de buffer de lavado frío (PBS, 2% de FBS y 0,02% de azida sódica). Se aspiró el sobrenadante celular y se agregaron 100 µl de buffer de lavado que contiene 300 µg/ml de anticuerpo OX40 reactivo no conjugado primario al pellet celular, se mezcló y se incubó durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, se agregó un anticuerpo secundario marcado con fluorocromo al tubo, se mezcló y se incubó durante 30 minutos adicionales a 4°C. Los anticuerpos marcados con fluorocromo reactivos OX40 se incluyeron en 10 µl de ficoeritrina (PE) marcada Ber Act 35 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA.), L106 marcada con PE (BD Pharmingen, San Jose, CA) o anticuerpo de OX40R conjugado

con Alexa Fluor 647. El anticuerpo de OX40R se marcó con fluorocromo usando el kit de marcación de proteína Alex Fluor 647 como describe el fabricante (Molecular Probes, Eugene, O). Después de la tinción, las células se lavaron posteriormente 3 veces con buffer de lavado, se resuspendieron en buffer de lavado frío y se recolectaron y analizaron 10.000 eventos usando un Becton Dickinson FACSCalibur y programa de computación CellQuest (San Jose, CA). Se despreciaron los anticuerpos que se unen al mismo epitope cuando el anticuerpo primario bloqueó la tinción del anticuerpo secundario marcado con fluorocromo en más de 80%.

[0150] Ensayo de inhibición de ligando del anticuerpo OX40-OX40R: Se analizaron los anticuerpos para determinar su capacidad de bloquear la unión del ligando 300-19 humano-OX40(L) que expresa las células a las placas recubiertas de OX40-proteínas de fusión de IgG10. La línea celular 300-19-OX40L se cultivó en el medio RPMI (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Hyclone, Logan, UT), 10 mM de HEPES, 1% de penicilina-estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 0,1 mM de aminoácidos esenciales, 0,05 mM de 2-mercapthoetanol y 0,5 mg/ml de Geneticina (Gibco, Grand Island, NY). La OX40-proteína de fusión de IgG1 humana contiene los primeros 220 aminoácidos de la proteína OX40 extracelular. La proteína de fusión se recubrió sobre las placas Nunc Maxisorb (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en 100 µl/pocillo (5 µg/ml) en buffer de recubrimiento (BupH, buffer carbonato-Bicarbonato, Pierce, Rockford, IL) y se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente, las placas se transfirieron a una toalla de papel para eliminar el líquido, se bloqueó con 200 µl/pocillo con buffer de bloqueo (5% de Carnation Milk diluida en PBS) y se incubó

a RT° durante horas. Las placas se lavaron con PBS y se agregaron varias diluciones de anticuerpo diluidas en PBS (50 µl/pocillo) a la placa de ensayo y se incubaron a RT° durante 30 minutos. Posteriormente, se agregaron 50 µl/pocillo de las células en PBS a razón de $6x10^5$/pocillo a los pocillos que contienen el anticuerpo y se incubaron durante 60 minutos adicionales a 37 °C en una cámara humidificada con 5% de $CO_2$. Las placas se lavaron con cuidado 2 veces con PBS para eliminar las células no adherentes y se midió la actividad celular en los pocillos por el agregado de 200 µl de una solución de PBS en diacetato de fluoresceína 20 ug/ml (Sigma, St. Louis, MO) a cada pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C en una cámara humidificada con 5% de $CO_2$ durante 90 minutos y se leyó usando un espectrofotómetro a 490 (Spectra Max 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

[0151] Ensayo de selectividad del anticuerpo OX40R (ELISA): Se recubrieron placas de Maxisorb de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 100 µl de proteínas de fusión miembro de la familia del receptor de TNFα a razón de 0,25 µg/ml de buffer carbonato diluido en BupH™, pH 9,4 (Pierce, Rockford, IL) y se incubó toda la noche a 4°C. Las proteínas de fusión del receptor de selectividad analizadas incluían CD40-Ig (Alexis Biochemicals, San Diego, CA), CD137-Ig (R&D Systems, Minneapolis, MN) y CD271-Ig (Alexis Biochemicals, San Diego, CA). También se incluyó como control positivo en cada ensayo la proteína de fusión OX40-Ig (construcción interna, Bioexpress, 97/2117). Luego las placas se lavaron tres veces con buffer de lavado que contiene 0,05% de Tween 20 (Sigma, St Louis, MO) diluido en PBS y se bloqueó con 300 µl de 0,5% de BSA (Sigma, St Louis, MO) en PBS (Sigma, St Louis, MO) durante 1 hora a RT°. Posteriormente, se

lavaron las placas y se agregaron 100 µl/pocillo de anticuerpos OX40 anti-humanos reactivos a las placas en varias concentraciones y se incubó durante 1 hora a RT°. Las placas se lavaron por completo tres veces y se detectó la unión de anticuerpo de OX40R con un anticuerpo de cadena kappa antihumana marcado con peroxidasa de rábano (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) a razón de 5 ng/ml durante 1 hora a RT°. Luego las placas se lavaron tres veces, seguido por la adición de 100 µl/pocillo de sustrato 1-Step Turbo-TMB (Pierce, Rockford, IL) durante 30 minutos a RT°. La reacción se detuvo por el agregado de un volumen igual de $H_2SO_4$. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un Molecular Devices Spectra Max 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

[0152] Reactividad cruzada de especies: Líneas celulares que expresan OX40R: La línea celular 300-19 que expresa tanto una construcción de fusión OX40-CD40 recombinante humana que corresponde a 1-235 de OX40R (dominio extracelular y transmembrana) y 216-278 de CD40 (dominio intracelular) como de proteína de OX40R completa de cynomolgus.

[0153] Preparación de linfocitos T humanos: Se recolectó sangre entera humana en jeringas heparinizadas (Baxter; Deerfield, IL) y luego se transfirió inmediatamente a tubos Sigma Accuspin (Sigma, St. Louis, MO) para el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) descripto por el fabricante. Los PBMC se lavaron dos veces con DPBS y se aislaron los linfocitos T usando una columna de purificación de células T descripta por el fabricante (R & D Systems, Minneapolis, MN). En breves palabras, los PBMC se resuspendieron en 2 ml de buffer de columna y se cargó en una columna de aislamiento de células T prelavadas. Los PBMC se incubaron durante 10

minutos a temperatura ambiente y las células T se eluyeron con buffer de columna, se lavaron una vez y se resuspendieron en TCM a $2x10^6$/ml que consiste en RPMI 1640 (Sigma, St Louis, MO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Hyclone, Logan, UT) y L-glutamina (2 mM), Hepes (10 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (50 ug/ml) (Gibco, Grand Island, NY.). Se agregó un volumen de 2 ml de células T que contienen un anticuerpo CD28 antihumano a razón de 1 ug/ml (clon 37407, R & D Systems, Minneapolis, MN) a los pocillos de una placa de 24 pocillos precubierta con un clon de anticuerpo CD3 antihumano UCTH1 (R & D Systems, Minneapolis, MN) a razón de 5 pg/ml en PBS. Los cultivos de células T se estimularon durante 3 día antes de analizarse para determinar la reactividad cruzada de OX40 humano por citometría de flujo.

[0154] Preparación de los PBMC de Cynomolgus: Se obtuvo sangre entera de Cynomolgus usando tubos vacutainer heparinizados (BD; Franklin Lakes, NJ) y se diluyó 1:4 en PBS. Se mezcló la sangre entera diluida y se colocaron cuidadosamente 15 ml sobre un volumen igual de Histopaque 1077 (Sigma, St Louis, MO). Los tubos se centrifugaron a 1000 x g durante 45 minutos a RT° y se recolectó la interfaz de PBMC mononucleares, se lavó una vez en PBS y se resuspendió durante 2 minutos a RT° con buffer de lisado ACK (Biosource, Rockville, MD) para eliminar cualquier RBC. Después de un lavado con PBS, se contaron los PBMC y se reajustaron a razón de $1x10^6$/ml en medio de cultivo de tejido (TCM). El TCM consistía en RPMI 1640 (Sigma, St Louis, MO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Hyclone Logan, UT) y L-glutamina (2 mM), Hepes (10 M), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (50 ug/ml) adquirido en Gibco (Grand Island, NY). Posteriormente, se

agregaron 2 ml de la preparación de PBMC que contiene un anticuerpo con reactividad cruzada con CD28 anti-humano (clon CD28.2, BD Biosciences, San Diego, CA) a los pocillos de una placa de 24 pocillos (Costar, Corning, NY) pre-recubierta con un anticuerpo CD3 anti-mono (clon FN18, Biosource, Camarillo, CA) a razón de µg/ml en PBS. Los cultivos de PBMC se estimularon durante 4 días antes de analizar la reactividad cruzada de OX40 humano por citometrí de flujo.

[0155] Preparación de PBMC de conejo: Se extrajo sangre entera de conejo en tubos vacutainer heparinizados (BD; Franklin Lakes, NJ) y se diluyeron inmediatamente 1:3 con HBSS caliente (Gibco, Grand Island, NY). Después de mezclar, se colocaron con cuidado 5 ml de sangre diluida y volumen igual de Lympholyte-Rabbit (Cedarlane Laboratories, Westbury, NY) y se centrifugaron durante 30 minutos a 25°C. Se recolectó la interfaz de PBMC, se lavó dos veces con PBS y se resuspendió en $2x10^6$/ml de TCM que contiene PHA a 10 ng/ml (Remel, Lenexa, KS). Las células se cultivaron durante 24-48 horas.

[0156] Preparación de PBMC caninos: Se recolectó sangre entera canina usando tubos vacutainer heparinizados (BD; Franklin Lakes, NJ). Posteriormente, la sangre se mezcló con volumen igual de HBSS caliente (Gibco, Grand Island, NY). Se colocaron lentamente cuatro ml de sangre diluida sobre 3 ml de Lympholyte-M (Cedarlane Laboratories, Westbury, NY) en tubos cónicos de 15 ml. Los tubos se centrifugaron durante 20 minutos a 800 x g y se recolectó la interfaz de PBMC, se lavó dos veces con HBSS y se resuspendieron en TCM a 2 x $10^6$/ml. Se agregaron los PBMC a los pocillos de una placa de 24 pocillos (2 ml/pocillo) y las células se estimularon con 2 µg/ml de ConA (Sigma, St. Louis, MO) durante 48 horas.

Organización y
Digitalización CSA Ltda

10-86027 (42)

[0157] Preparación de PBMC murinos y de rata: La sangre entera de rata recolectada en jeringas heparinizadas se diluyó 1:3 en HBSS caliente. Posteriormente, se colocaron con cuidado 5 ml sobre un volumen igual de Lympholyte-Rat (Cedarlane Laboratories, Westbury, NY). Los tubos se centrifugaron durante 20 minutos a 1500 RPM. Se recolectó la interfaz de PBMC, se lavó dos veces y el pellet celular se reajustó a $2x10^6$/ml en TCM. Dos ml de células se agregaron a cada pocillo de una placa de 24 pocillos y se estimularon durante 24-48 horas con PHA (Remel, Lenexa, KS) a 10 ng/ml antes de la tinción de citometría de flujo.

[0158] Tinción de citometría de flujo para reactividad cruzada de las especies: Los PMMC de ratón, rata, conejo, perro y cynomolgus estimulados y la línea celular 300-19 que expresa el receptor OX40 de cynomolgus se usaron para analizar la reactividad cruzada de especies de anticuerpo OX40 humano. Los linfocitos T activados que expresan OX40 humano y células 300-19 transducidas con OX40 se usaron como controles positivos. Las células ($5,0x10^5$/tubo) se lavaron una vez en buffer de lavado frío (PBS, 2% de FBS y 0,02% de azida sódica) y se agregaron 100 µl/tubo de control conjugado con Alexa Fluor 647 o anticuerpos OX40 reactivos a razón de 5 ug/ml a cada tubo. Los anticuerpos se marcaron usando un kir de marcación de proteína Alex Fluor 647 descripto por el fabricante (Molecular Probes, Eugene, O). Las células se incubaron en la oscuridad con anticuerpos con fluorocromo en hielo durante 30 minutos, se lavaron tres veces y se resuspendieron en 0,5 ml de buffer de lavado para el análisis. La tinción de anticuerpos se midió y analizó usando un Becton Dickinson FACSCalibur y programa de computación CellQuest (San Jose, CA).

[0159] Ensayo de actividad de luciferasa: se prepararon células 293T que contiene el dominio extracelular del OX40 y el dominio intracelular de CD40 fusionados con un indicador NfkB que contiene luciferasa. Las células se recolectaron, se lavaron y se resuspendieron en medio completo libre de rojo fenol (DMEM que contiene 10% de suero fetal bovino, buffer HEPES, aminoácidos no esenciales y L-glutamina) a una densidad de 0,5 X $10^6$ células/ml. Se sembraron 80 ul de células en cada pocillos de ensayo de una placa de 96 pocillos (PerkinElmer, número de partes 6005680). Se agregaron anticuerpos de ensayo a cada pocillo solo o en presencia de un entrecruzamiento del anticuerpo IgG anti humano de cabra anticuerpo Fab' de cabra de IgG anti-humana (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). La placa se incubó toda la noche a 37°C. Se agregaron 100 ul de luciferasa (Promega, sistema de ensayo Bright-glo lucifera, Cat. # E2620) el día siguiente y se midió la actividad de luciferasa mediante un contador de centelleo (TopCount, Packard -NXT).

[0160] Ensayo de αCD3 IL-2 humana: Se recolectó sangre entera humana en jeringas heparinizadas (Baxter; Deerfield, IL), se colocó sobre tubos Accuspin (Sigma; St. Louis, MO) y se centrifugó durante 15 minutos a 2000 rpm. Se recolectó la capa leucocitaria, se lavó con PBS (Sigma, St. Louis, MO), y los eritrocitos se lisaron con agua. Las células T se separaron de las columnas de enriquecimiento en CD3+ humano (R&D; Minneapolis, MN), se contaron y ajustaron a 1 x $10^6$/ml en medio RPMI (Gibco; Grand Island, NY) que contiene: 10% de suero de ternero fetal (Hyclone; Logan, UT), 10 mM de hepes, 1% de penicilina-estreptomicina, 2 mM de L-glutamina y 0,1 mM de aminoácidos esenciales (all Gibco). En forma

concurrente, se colocó clon anti-CD3ε #UCHT1 (sistemas R&D, Minneapolis, MN) a razón de 2,5 µg/ml en PBS en una placa de 24 pocillos (Costar; Corning, NY) y se incubó durante 2 horas a 37°C. Las placas se lavaron 3x con PBS y se agregó a los pocillos lo siguiente: células T a razón de 1 x $10^6$/pocillo, diluciones seriadas de anticuerpos OX40 (o control de $IgG_2$ KLH) y $F(ab')_2$ de cabra IgG Fcγ anti humana para entrecruzarse (agregada a razón de 2,5 ug/mL). Los sobrenadantes se recolectaron a 48 y 72 horas y se midieron los niveles de IL-2 por ELISA (R&D).

[0161] Ensayo de αCD3 IL-2 de cynomolgus: Se recolectó sangre entera de mono cynomolgus en tubos heparinizados (BD; Franklin Lakes, NJ), se diluyó 1:4 en PBS, se colocó sobre Histopaque 1077 (Sigma, St Louis, MO) y se centrifugó durante 45 minutos a 2200 rpm. Se recolectó la capa leucocitaria, se lavó con PBS y los eritrocitos se lisaron con agua. Las células se ajustaron a razón de 1 x $10^6$/ml y se agregaron a una placa de 24 pocillos que había sido pre-cubiertas durante 2 horas con concentraciones variadas de anti-CD3 de mono, clon FN-18 (Biosource; Camarillo, CA) a 37°C. Se agregaron diluciones seriadas de Anticuerpo de OX40 (o control de $IgG_2$ KLH) asi como $F(ab')_2$ de cabra IgG Fcγ anti humana a razón de 2,5 ug/mL a los pocillos. Los sobrenadantes se recolectaron a 48 y 72 horas y se midieron los niveles de IL-2 por ELISA (Biosource, Camarillo, CA ).

[0162] Ensayo de células T activadas con alcantígeno: se incubaron células T humanas recién aisladas (ver anteriormente) con células tumorales alogeneicas tratadas con mitomicina c (Raji) durante 3-4 días. Luego las células T se recolectaron, se lavaron y se dejaron en reposo durante 1 día en medio fresco antes de estimular

con 11D4. Se midió el nivel de IL-2 24 horas después por ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN).

[0163] **B. Procedimientos de estudios in vivo**

[0164] Modelos de tumor humano en SCID-beige usando ratones injertados con células T humanas y células dendríticas: Los ratones SCID-beige (Taconic #CBSBG-MM) se aclimataron durante 5-7 días después de la llegada antes de usar. Se usaron las siguientes líneas celulares de tumorales: RAJI, ATCC #CCL-86; BT-474, ATCC #HTB-20; PC-3, ATCC#-1435; y LoVo, ATCC# CCL-229.

[0165] Los linfocitos T purificados (células T) y los monocitos derivados de células de dendríticas se prepararon a partir de sangre humana de la siguiente manera: Se recolectaron células mononucleares humanas a partir de sangre heparinizada usando tubos Sigma Accuspin #A7054. Las células se recolectaron, se colocaron en un matraz T75 y se incubaron durante 3 horas a 37°C en un incubador humidificado bajo 5% de $CO_2$. Las células no adherentes se recolectaron y guardaron (ver más adelante). El matraz con las células adherentes se incubó con 20 ml' de medio completo RPMI (que contiene 10% de cuero de ternero fetal) suplementado con IL-4 (R&D) a 10 ng/ml y GM-CSF (R&D) a 100 ng/ml. Posteriormente el cultivo se incubó durante 6-7 días a 37°C en un incubador humidificado bajo 5% de $CO_2$. Los monocitos no adherentes derivados de células dendríticas se recolectaron posteriormente por decantación y lavado del matraz varias veces con medio completo RPMI.

[0166] Las células mononucleares no adherentes iniciales se usaron para purificar células T por medio de la selección negativa de alta afinidad usando columnas de enriquecimiento en células T (R&D) según las instrucciones del fabricante. Las células T purificadas

se criopreservaron en medio de cultivo de recuperación de células a $10^7$/ml y se conservaron en nitrógeno líquido hasta su uso. Las células tumorales (1 x 107) se inyectaron por vía subcutánea (SC) con las células T (1 x 10) y monocitos derivados de células dendríticas (5 x $10^5$) del mismo dador, a razón de 0,2 mL/ratón. Se controló el crecimiento del tumor durante el tiempo con calibres.

[0167] **C. Resultados para el anticuerpo 11D4**

[0168] (1) Estudios in vitro:

[0169] Ciertas propiedades del anticuerpo 11D4 proveniente de estudios in vitro se sintetizan en la Tabla 3.

[0170] El anticuerpo 11D4 se une al OX40R con alta afinidad.

[0171] Esto se demostró por el uso de una proteína de fusión de IgG1 que contiene el dominio extracelular del OX40R y en células totales (células transfectadas con OX40R+ y células T primarias activadas). En los ejemplos que usan proteína de fusión de IgG1, 11D4 se unión al dominio extracelular del OX40R con una $EC_{50}$ de 0,5 +/- 0,18 µg/mL (3,5 nM). Esta unión se confirmó en células pre-B 300-19 que expresan el dominio extracelular del OX40R de longitud completa (no se observó unión en las células 300-19 progenitoras). La $EC_{50}$ para la unión de las células transfectadas con OX40R fue 0,2 +/- 0,16 µg/mL (1,7 nM). Con el fin de confirmar que la unión se observó en las células T primarias, se aislaron células T de sangre periférica de dadores humanos múltiples y se estimuló con anti-CD3 y anti-CD28 durante 2 días para regular por aumento la expresión del OX40R. Los datos de unión de saturación en estas células T indicó que 11D4 se une con una $EC_{50}$ de 0,6 +/-1,0 µg/mL (4,0 nM, N = 17

dadores). Estos datos demuestran que 11D4 se une con avidez al OX40R.

[0172] A fin de caracterizar adicionalmente estos datos de unión, se recolectaron datos para evaluar la región del dominio extracelular del OX40R donde 11D4 interactúa y también para determinar si el receptor se interiorizó después de la unión. Los datos de unión competitiva para la proteína de fusión de IgG1 OX40R indicó que 11D4 compite para unirse con las células que expresan el ligando de OX40, lo que proporciona evidencia de que 11D4 interactúa en la región de unión del ligando del receptor. Además, 11D4 no compite en forma cruzada con dos anticuerpos de OX40R disponibles en el comercio, BerAct35 y L106, para unirse a las células T tal como se evalúa por análisis FACS. El análisis FACS que anticuerpos de detección no competitiva indicó que el OX40R no se interiorizó después de la pre-incubación de células T primarias activadas con 11D4 durante 30 minutos. Su afinidad de unión, determinada por análisis Biacore usando la proteína de fusión del dominio extracelular de OX40R como ligando inmovilizado, indicó que la constante de disociación de equilibrio ($K_D$) de 11D4 para la unión fue 0,48 nM. Estos análisis también estimaron la constante de disociación (kd) de 11D4 es 5,72 E-05 1/s. En consecuencia, 11D4 se une con alta afinidad a la región de unión al ligando del OX40R, tiene una constante de disociación lenta y no se interioriza en el receptor después de la unión.

[0173] *El anticuerpo 11D4 se une selectivamente al OX40R*

[0174] Se evaluó la selectividad de 11D4 para el OX40R frente a otros miembros de la superfamilia de TNFR usando los datos relacionados con las construcciones de proteína de fusión de IgG1 que contienen el respectivo dominio

extracelular del receptor relacionado. Estos receptores incluyeron el receptor de CD40, receptor de 4-1BB (CD137) y el receptor del factor de crecimiento nervioso (CD271). En todos los casos, no se observó unión significativa en concentraciones de hasta 100 µg/mL (700 nM) en estos receptores. Cuando se compara con la unión observada con la proteína de fusión OX40R ($EC_{50}$ = 0,5 µg/ml), estos datos demuestran que 11D4 es >100 veces selectivo para el OX40R versus otros miembros de la familia analizados (Ver Figuras 1a y 1b).

[0175] Actividad funcional del anticuerpo 11D4:

[0176] La actividad funcional de 11D4 se demostró en las células transfectadas con OX40R+ y las células T primarias. En estos ensayos, 11D4 demuestra actividad agonista cuando se agrega a las células con o sin anticuerpo secundario, $F(ab')_2$ de cabra de IgG Fcγ antihumana.

[0177] En el primer conjunto de experimentos, se evaluó 11D4 en cuanto a la actividad agonista usando células 293 transfectadas con el dominio extracelular y de transmembrana del OX40R fusionado al dominio intracelular de CD40 con indicador de luciferasa FkB. En este ensayo, 11D4 aumentó la señalización mediante el OX40R con una $EC_{50}$ media de 0,33 µg/mL (2,2 nM, N= 4). Una curva representativa de concentración-respuesta para la inducción de luciferasa por 11D4 se muestra en la Figura 2. En ausencia del anticuerpo secundario $F(ab')_2$, la magnitud de la actividad de luciferasa se redujo 4 veces junto con la $EC_{50}$.

[0178] Como evidencia adicional para la actividad agonista del 11D4, se generaron células T específicas de antígeno. Se incubaron células T humanas recién aisladas con células tumorales alogeneicas tratadas con mitomicina

c (Raji) durante 3-4 días. Luego las células T se recolectaron, se lavaron y dejaron reposar durante 1 día en medio fresco antes de estimular con 11D4. El análisis FACS indicó un alto nivel de expresión de OX40R en estas células incluso después del reposo. 11D4 indujo altos niveles de IL-2 por estas células, en algunos casos que exceden 100 ng/mL (Figura 3). La $EC_{50}$ promedio para esta respuesta de 2 ejemplos separados fue 0,008 +/- 0,006 µg/mL. En ausencia de 11D4, estas células solo secretaron niveles mínimos de IL-2.

[0179] 11D4 también aumenta la producción de IL-2 por las las células T primarias humanas estimuladas con anti-CD3. Si bien la relación señal a ruido de este ensayo fue baja en algunos ensayos debido a la inducción de IL-2 por anti-CD3 solo, 11D4 aumentó la producción de IL-2 cuando se agregó con $F(ab')_2$ de cabra de IgG Fcγ antihumana. No se observó actividad de 11D4 sobre las células T recién aisladas en ausencia de anti-CD3. La magnitud de aumento de IL-2 por 11D4 varió de 2,3 a 57 veces versus anti-CD3 solo de acuerdo con el dador y la cantidad de IL-2 generada por anti-CD3. El efecto de 11D4 sobre la producción de IL-2 por las celulas T primarias humanas estimuló con 2,5 µg/mL de anti-CD3 se representa en la Figura 4 (usando una curva de 8 puntos de concentración con 1:3 diluciones). La $EC_{50}$ promedio calculada a partir de estos datos que usó curvas de respuesta de concentración de 8 puntos fue 0,042 +/- 0,01 µg/mL (ver Tabla 4).

[0180] También se analizó la actividad funcional de 11D4 sobre la producción de IL-2 usando células de mono estimuladas con anti-CD3 y 11D4 (junto con el anticuerpo secundario $F(ab')_2$). Los resultados se representan en la Figura 5 y Tabla 5. Estos datos indicaron que la $EC_{50}$

para 11D4 fue similar entre las células de mono y humanas (0,022 versus 0,042 µg/mL para las células humanas), pero la magnitud de IL-2 inducida por encima de anti-CD3 solo fue significativamente menor usando células T de Cynomolgus (aprox. 35 veces, 5762 +/- 4748 pg/mL de IL-2 para células humanas (N = 21) versus 261 +/- 294 pg/mL de IL-2 para las células de mono (N = 9).

[0181] **Reactividad cruzada de especie**:

[0182] Se evaluó 11D4 para determinar su capacidad de unirse a las células T de múltiples especies. Las células T se aislaron de ratón, rata, conejo, perro y mono y se activaron con anti-CD3 más anti-CD28 o mitógeno. No se observó unión en ratón, rata, conejo o perro como indicó el análisis por FACS. La falta de unión al OX40R de ratón también se confirmó por ELISA usando una proteína de fusión disponible en el comercio que contiene el dominio extracelular del OX40R murino. En contraste, 11D4 se une a las células T de mono Cynomolgus determinado por un ensayo de unión de saturación por FACS. El rango de valores de $EC_{50}$ obtenidos mediante diferentes monos se muestra en la Figura 6. Para comparación, el rango de valores de $EC_{50}$ obtenidos mediante las células humanas se muestra en la Figura 7. Si bien es variable, el rango de valores de $EC_{50}$ fue similar entre las células de mono y humanas (los valores medios son 0,354 µg/mL para las células de mono versus 0,566 µg/mL para las humanas).

[0183] (2) **Estudios in vivo:**

[0184] La falta de reactividad cruzada de 11D4 con el OX40R murino requerido para el desarrollo de un modelo de tumor f a xenogénico usando ratones beige con inmunodeficiencia combinada severa (SCID). Los ratones SCID-beige carecen de linfocitos T y B murinos y las células NK los convierten en receptores ideales para el

trasplante de células inmunes humanas y el crecimiento de tumores humanos. Se analizaron cuatro líneas celulares tumorales que representan diversos tipos de tumor en este modelo in vivo. Ninguna de las líneas tumorales expresaron OX40R. En todos los casos, las células tumorales ($1 \times 10^7$) fueron inyectadas por vía subcutánea (SC) con células T ($1 \times 10^6$) y monocitos derivados de células dendríticas ($5 \times 10^5$) del mismo dador. El 11D4 administrado por inyección intraperitoneal (IP) inhibió el crecimiento del tumor hasta el 98% en estos modelos sintetizado en la tabla 6. Se seleccionó la vía IP de administración para 11D4 debido a su facilidad de administración y rápida diseminación en sangre periférica.

[0185] **Eficacia de 11D4 contra un linfoma de células B en ratones SCID-beige**:

[0186] Se inyectaron ratones SCID-beige por vía SC con el linfoma de células B de Burkitt, Raji, junto con las células humanas T y monocitos derivados de células dendríticas. Los ratones recibieron una inyección única IP de 11D4 o un control del isotipo del anticuerpo ($IgG_2$ de anti-KLH) en el momento de la inyección del tumor. Como se muestra en la Figura 8, 11D4 redujo la tasa de crecimiento tumoral en animales tratados. El tamaño del tumor de cada animal individual (N = 10) en el día 21 después del estímulo se muestra en la Figura 9, que ilustra el 64% de inhibición del crecimiento tumoral en un nivel de dosis de 10 mg/kg. No se observó actividad en ausencia de las células T y células dendríticas.

[0187] **Eficacia de 11D4 en un modelo de tumor de próstata**:

[0188] Los ratones SCID-beige se inyectaron por vía SC con el adenocarcinoma de próstata PC-3 junto con las

células T humanas y las células dendríticas derivadas de monocitos. Los ratones recibieron una inyección IP única de 11D4 o un isotipo del anticuerpo control (IgG2 anti-KLH) en el momento de la inyección del tumor. Los resultados que se representan en la Figura 10, muestran que el tratamiento con 11D4 produjo una inhibición del crecimiento del tumor dependiente de la dosis. El tamaño del tumor de cada animal individual (N = 10) de este estudio en el día 27 después del estímulo se muestra en La Figura 11, que ilustra un 70% de inhibición del crecimiento del tumor cuando los animales se administraron con una inyección única de 1,0 mg/kg de 11D4, y 90% de inhibición a una dosis de 10 mg/kg. Los niveles plasmáticos de 11D4 determinado en el día 27 en estos animales fueron 6,2 µg/mL en el nivel de dosis de 1,0 mg/kg.

[0189] **Eficacia de 11D4 en un modelo de tumor del carcinoma de colon**:

[0190] Los ratones SCID-beige se inyectaron por vía SC con el adenocarcinoma colorrectal LoVo junto con los linfocitos T humanos y células dendríticas autólogas derivadas de monocitos. Los ratones recibieron una inyección IP única de 11D4 o un anticuerpo control (IgG2 anti-KLH) en el momento de la inyección del tumor. Los resultados que se representan en la Figura 12, muestran que 11D4 dependiente de dosis redujo el crecimiento del tumor en estos animales. El tamaño del tumor de cada animal individual (N = 10) de este estudio en el día 27 después del estímulo se muestra en La Figura 13, que ilustra una 64% de inhibición del crecimiento del tumor usando una dosis única de 1,0 mg/kg y una 87% de inhibición de crecimiento del tumor a un nivel de dosis de 10,0 mg/kg.

[0191] **Eficacia de 11D4 en un modelo tumoral de carcinoma mamario:**

[0192] Los ratones SCID-beige se inyectaron por vía SC con le carcinoma mamario BT474 junto con los linocitos T humanos y las células dendríticas autólogas derivadas de monocitos. Los ratones recibieron dos inyecciones (IP) de 11D4 o un anticuerpo control (IgG2 anti-KLH) en el momento de la inyección del tumor y nuevamente 30 días más tarde. Los resultados que se representan en la Figura 14, muestran que 11D4 redujo el crecimiento tumoral en estos animales. El tamaño del tumor de cada animal individual (N = 10) de este estudio en el día 85 después del estímulo se muestra en La Figura 15 que ilustra un 98% de inhibición del crecimiento del tumor en un nivel de dosis de 10,0 mg/kg y 85% de inhibición a una dosis de 1 mg/kg.

[0193] **D. Resultados para el anticuerpo 18D8**

[0194] (1) **Estudios in vitro:**

[0195] Los resultados del estudio in vitro para el anticuerpo 18D8 se sintetizan en la Tabla 7.

[0196] Efecto del anticuerpo 18D8 sobre la producción de IL-2 inducida por anti-CD3 por las células T primarias humanas de diferentes dadores también se muestran en la Tabla 8.

[0197] (2) **Estudios in vivo:**

[0198] **Eficacia de 18D8 frente a linfoma de células B en el modelo de ratones SCID-beige**

[0199] Los ratones SCID-beige se inyectaron por vía SC con linfoma de células B de Burkitt, Raji, junto con linfocitos T humanos y monocitos antólogos derivados de células dendríticas. Los ratones recibieron una inyección IP única de 18D8 o un isotipo del anticuerpo control (IgG2 anti-KLH) en el momento de la inyección del tumor.

Se usaron diez animales por grupo en cada estudio. Los resultados de dos estudios se presentan en la Tabla 9. Los resultados muestran que 18D8 produjo eficacia antitumoral significativa en las dosis de 1,0 mg/kg y 10 mg/kg. No se observó actividad en ausencia de las células T y células dendríticas, lo que sugiere que este efecto antitumoral puede ser inmunomediado.

[0200] **Eficacia de 18D8 contra el tumor de próstata en un modelo de ratones SCID-beige**

[0201] Los ratones SCID-beige se inyectaron por vía SC con el adenocarcinoma de próstata PC-3 junto con las células T humanas y celulas dendríticas autólogas derivadas de monocitos. Los ratones recibieron una inyección IP única de 18D8 o un isotipo del anticuerpo control (IgG2 anti-KLH) en el momento de la inyección del tumor. Se usaron diez animales por grupo en cada estudio. Los resultados de dos estudios se presentan en la Tabla 9. Los resultados muestran que el tratamiento con 18D8 produjo 42%, 90%, y 88% de inhibición del crecimiento tumoral a las dosis de 0,1 mg/kg, 1,0 mg/kg, y 10 mg/kg, respectivamente.

[0202] **Información de depósito**

[0203] Los solicitantes han depositado un cultivo de E.coli DHα5 que contiene un plásmido que codifica la cadena pesada del anticuerpo 11D4 y un cultivo de E.coli DHα5 que contiene el plásmido que codifica la cadena liviana del anticuerpo 11D4 de las colecciones de American Type Culture (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, del 10 de julio de 2007, que han sido asignados con los números de depósito PTA-8524 y PTA-8525, respectivamente. Estos depósitos se realizaron bajo las condiciones del Tratado de Budapest bajos la International Recognition of the Deposit of

Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and Regulations (Tratado de Budapest). Estos depósitos se mantendrán sin restricción en depósito de ATCC durante un período de 30 años, o 5 años después de la solicitud más reciente, o por la duración efectiva de la patente, la que sea más larga y se reemplacará silos depósitos se vuelven no viables durante este período. La disponibilidad de los materiales depositados no se interpreta como una licencia para practicar la invención en contravención de los derechos otorgados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patente.

[0204] Todas las referencias mencionadas en esta memoria descriptiva, que incluyen, sin limitación, todos los documentos, publicaciones, patentes, solicitudes de patentes, libros, artículos de revistas, se incorporan por la presente como referencia en esta memoria descriptiva en su totalidad. La descripción de las referencias en la presente se considera que solo sintetiza las afirmaciones realizadas por sus autores y no se hace admisión de que cualquier referencia constituye arte previo.

[0205] Si bien la precedente invención se ha descripto en algún detalle por medio de ilustraciones y ejemplos con fines de aclarar la comprensión, será claramente evidente para los expertos en el arte a la luz de las enseñanzas de la presente que se pueden realizar ciertos cambios y modificaciones a la invención sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones anexas.

**TABLA 1. Identificadores de secuencia para los anticuerpos 11D4 y 18D8**

| SEC ID NO: | Anticuerpo | Secuencia |
|---|---|---|
| 1 | 11D4 | Aminoácido de CDR1 de $V_H$ |
| 2 | 11D4 | Aminoácido de CDR2 de $V_H$ |
| 3 | 11D4 | Aminoácido de CDR2 de $V_H$ |
| 4 | 11D4 | Aminoácido de CDR1 de $V_L$ |
| 5 | 11D4 | Aminoácido de CDR2 de $V_L$ |
| 6 | 11D4 | Aminoácido de CDR3 de $V_L$ |
| 7 | 11D4 | Aminoácido de $V_H$ |
| 8 | 11D4 | Aminoácido de $V_L$ |
| 9 | 11D4 | Aminoácido de cadena pesada |
| 10 | 11D4 | Aminoácido de cadena liviana |
| 11 | 11D4 | Ácido nucleico de $V_H$ |
| 12 | 11D4 | Ácido nucleico de $V_L$ |
| 13 | 18D8 | Aminoácido de CDR1 de $V_H$ |
| 14 | 18D8 | Aminoácido de CDR2 de $V_H$ |
| 15 | 18D8 | Aminoácido de CDR3 de $V_H$ |
| 16 | 18D8 | Aminoácido de CDR1 de $V_L$ |
| 17 | 18D8 | Aminoácido de CDR2 de $V_L$ |
| 18 | 18D8 | Aminoácido de CDR3 de $V_L$ |
| 19 | 18D8 | Aminoácido de $V_H$ |
| 20 | 18D8 | Aminoácido de $V_L$ |
| 21 | 18D8 | Aminoácido de cadena pesada |
| 22 | 18D8 | Aminoácido de cadena liviana |
| 23 | 18D8 | Ácido nucleico de $V_H$ |
| 24 | 18D8 | Ácido nucleico de $V_L$ |

**TABLA 2A. Secuencias de aminoácidos para el anticuerpo 11D4**

| DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (Región variable en caso superior, región constante en caso inferior, CDR subrayados) |
|---|---|
| Cadena pesada | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAP GKGLEWVSYISSSSSTIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRDEDTAVYYCARESGWYLFDYWGQGTLVTVSSastkgpsvfpl apcsrsteastaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssnfg tqtytcnvdhkpsntkvdktverkccvecppcpappvagpsvflfppkpkdtlmisrtpevtc vvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvvsvltvvhqdwlngkeykc kvsnkglpapiektisktkgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesn gqpennykttppmldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspg k |
| Cadena liviana | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYNSYPPTFGGGTKVEIKrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfy preakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglss pvtksfnrgec |

**TABLA 2B. Secuencias de aminoácidos para el anticuerpo 18D8**

| | SECUENCIA |
|---|---|
| DESCRIPCIÓN | (Región variable en caso superior, región constante en caso inferior, CDR subrayados) |
| Cadena pesada | EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAP GKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTALYYCAKDQSTADYYFYYGMDVWGQGTTVTVS Sastkgpsvfplapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysl ssvvtvpssnfgtqtytcnvdhkpsntkvdktverkccveccppcpappvagpsvflfppkpk dtlmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvvsvltvvh qdwlngkeykckvsnkglpapiektisktkgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgf ypsdiavewesngqpennykttppmldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealh nhytqkslslspgk |
| Cadena liviana | EIVVTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQQRSNWPTFGQGTKVEIKrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypre akvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglspvt ksfnrgec |

**TABLA 3. Síntesis de ciertas propiedades in vitro del anticuerpo 11D4**

| Parámetro | Actividad µg/ml (nM) |
|---|---|
| Afinidad para OX40R: (Biacore)<br>$K_D$<br>Tasa de disociación (Kd) | <br>0,07 0,48<br>5,7E-05 1 /s |
| Unión a OX40R:<br>Dominio extracelular de la proteína de fusión<br>Unión de saturación ($EC_{50}$):<br>células T estimuladas con CD31CD28 (N = 17)<br>OX40R+ células 300-19 (N = 5) | <br>0,5 ± 0,18 3,50<br><br>0,6 ± 1 4,00<br><br>0,2 ± 0,16 1,70 |
| Estimulación in vitro de células trasfectadas con OX40R+ (luciferasa) ($EC_{50}$; N =4) | 0,33 ± 0,22 2,20 |
| Aumento de actividad de células T:<br>- Producción de IL-2, inducida por CD3 (N =12)<br>- Estimulación de la producción de IL-2 por células activas por antígeno (N = 2) | <br>0,042 ± 0,01 0,30<br>0,008 ± 0,006 0,04 |
| Selectividad (unión) (CD40, CD 137, CD271) | > 100 µg/mL > 700,00 |

Los valores representan la media ± 1 SD

**TABLA 4. Efecto del anticuerpo 11D4 sobre la producción de IL-2 inducida por anti-CD3 por las células T primarias humanas**

| EC50 (µg/mL) | IL-2 máxima (pg/mL) | ECmax (µg/mL) | Índice de estimulación | Dador |
|---|---|---|---|---|
| 0,008 | 4831 | 0,05 | 3,8 | 1 |
| 0,011 | 5450 | 0,05 | 2,6 | 2 |
| 0,014 | 6571 | 0,5 | 2,3 | 3 |
| 0,014 | 7271 | 0,05 | 5,9 | 4 |
| 0,011 | 6313 | 0,05 | 9,1 | 5 |
| ND | ND | ND | 7,0 | 6 |
| 0,010 | 1006 | 0,05 | 4,8 | 7 |
| ND | ND | ND | 5,9 | 8 |
| ND | ND | ND | 25,4 | 9 |
| ND | ND | ND | 57,0 | 10 |
| ND | ND | ND | 8,3 | 11 |
| ND | ND | ND | 5,1 | 12 |
| ND | ND | ND | 2,7 | 13 |
| ND | ND | ND | 4,6 | 14 |
| 0,014 | 4687 | 0,05 | 6,0 | 15 |
| 0,014 | 3012 | 0,05 | 35,2 | 16 |
| ND | ND | ND | 21,4 | 17 |
| 0,029 | 2796 | 0,125 | 3,8 | 18 |
| 0,052 | 1718 | 0,125 | 5,5 | 19 |
| 0,020 | 14190 | 0,56 | 16,8 | 20 |
| 0,068 | 1611 | 1,67 | 7,9 | 21 |

IL-2 máxima: Cantidad de IL-2 producida con 11D4 en ECmax respecto de anti-CD3 solo

ECmax: Concentración de 11D4 que produce el máximo nivel de IL-2 respecto de anti-CD3 solo

Índice de estimulación: Relación del nivel máximo de IL-2 producida con 11D4 versus la cantidad de IL-2 producida

con anti-CD3 solo

ND = no determinado

Los valores para los últimos cuatro dadores (18-21) son de las curvas dosis respuesta realizadas con 8 puntos de diluciones 1:3 o 1:4; los otros valores representan curvas de dilución logarítmicas. La $EC_{50}$ de las curvas de concentración de 1:3 y 1:4 fue 0,042 +/- 0,01 ug/mL, N = 4.

**TABLA 5. Efecto del anticuerpo 11D4 sobre la producción de IL-2 inducida por anti-CD3 por las células T de Cynomolgus**

| EC50 (µg/mL) | IL-2 máxima inducida (pg/mL) | ECmax (µg/mL) | Índice de estimulación | Dador |
|---|---|---|---|---|
| 0,007 | 376 | 0,05 | 3,5x | 32750 |
| 0,002 | 116 | 0,05 | 2,2x | 2325 |
| ND | ND | ND | 2,0x | 32405 |
| 0,007 | 167 | 0,05 | 34,4 | 32081 |
| 0,011 | 978 | 0,005 | 5,6x | 32842 |
| ND | ND | ND | 6,3x | 2325 |
| 0,008 | 40 | 0,021 | 2,7x | 33081 |
| 0,031 | 168 | 0,062 | 5,0x | 33080 |
| 0,028 | 128 | 0,062 | 3,8x | 33062 |

IL-2 máxima: Cantidad de IL-2 producida con 11D4 en ECmax respecto de anti-CD3 solo

ECmax: Concentración de 11D4 que produce el máximo nivel de IL-2 respecto de anti-CD3 solo

Índice de estimulación: Relación del nivel máximo de IL-2 producida con 11D4 respecto de la cantidad producida con anti-CD3 solo

ND = no determinado

[206] Los valores para los tres últimos dadores (33081,

33080 y 33062) de la Tabla 6 son de las curvas dosis respuesta realizadas con 8 puntos de diluciones 1:3. Los otros valores representan curvas de dilución logarítmicas. La $EC_{50}$ derivada de estas curvas que usa diluciones 1:3 fue 0,022 +/-0,01;

**TABLA 6. Inhibición de crecimiento tumoral humano por el anticuerpo 11D4 en ratones SCID-beige injertados con las células T humanas y las células dendríticas**

| Tipo de tumor | Dosificación con 11D4 | Duración del estudio | 10 mg/kg | 1,0 mg/kg | 0,1 mg/kg | 0,01 mg/kg |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Raji: Linfoma de células B | Día 1 | 21 días | 64% | 42% | 27% | nd |
| Raji: Linfoma de células B | Día 1 | 21 días | nd | 75% | 42% | 8% |
| Lovo: carcinoma de colon | Día 1 | 25 días | 76% | 44% | 20% | nd |
| Lovo: carcinoma de colon | Día 1 | 25 días | 87% | 64% | 15% | nd |
| PC3: próstata | Día 1 | 27 días | 90% | 77% | 45% | nd |
| PC3: próstata | Día 1 | 27 días | 90% | 70% | 50% | nd |
| BT474: mamas | Día 1 y 30 | 85 días | 98% | 85% | 46% | nd |

Valores = % de inhibición de crecimiento tumoral determinado a la terminación del estudio

[0207] nd = no detectado

**TABLA 7. Resultados de estudios in vitro con el anticuerpo 18D8**

| Parámetro | Actividad<br>µg/ml (nM) |
|---|---|
| Afinidad para OX40R: (Biacore)<br>$K_D$<br>Tasa de disociación (Kd) | <br><br>0,49 3,38<br>2,9E-04<br>/s |
| Unión a OX40R:<br>Dominio extracelular de la proteína de fusión<br>Unión de saturación ($EC_{50}$):<br>células T estimuladas con CD31CD28 (N = 4)<br>OX40R+ células 300-19 (N = 2) | <br>0,034 ± 0,001 0,23<br><br>1,06 ± 0,51 7,30<br><br>0,24 ± 0,09 1,66 |
| Aumento de actividad de células T:<br>- Producción de IL-2, inducida por CD3 (N =4)<br>- Estimulación de la producción de IL-2 por células activas por antígeno (N = 1) | <br>0,049 ± 0,06 0,33<br><br>0,014 ± 0 0,10 |
| Selectividad (unión) (CD40, CD 137, CD271) | <br>> 100 µg/mL > 700,00 |

Los valores para actividad expresada en µg/ml representan la media +/- un SD.

**TABLA 8. Efecto del anticuerpo 18D8 sobe la sobre la producción de IL-2 inducida por anti-CD3 por las células T primarias humanas**

| EC50 (pg/mL) | IL-2 máxima (pg/mL) | ECmax (µg/mL) | Índice de estimulación | Dador |
|---|---|---|---|---|
| 0,013 | 1120 | 0,05 | 13,7 | LC |
| 0,024 | 4334 | 0,5 | 5,1 | TH |
| 0,024 | 2280 | 0,5 | 5,4 | KO |
| 0,135 | 1356 | 0,5 | 2,4 | RN |

IL-2 máxima: Cantidad de IL-2 producida con 18D8 en ECmax respecto de anti-CD3 solo

ECmax: Concentración de 18D8 que produce el máximo nivel de IL-2 respecto de anti-CD3 solo

Índice de estimulación: Relación del nivel máximo de IL-2 producida con 18D8 respecto de la cantidad producida con anti-CD3 solo

Los valores representan curvas logarítmicas de dilución.

**TABLA 9. Inhibición del crecimiento tumoral humano por el anticuerpo 18D8 en ratones SCID-beige**

| | | | Nivel de dosis de 18D8 (mg/kg) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Tipo de tumor | Dosificación con 18D8 | Duración del estudio | 10 | 1,0 | 0,1 | 0,01 |
| Raji: Linfoma de células B | Día 1 | 23 días | 73% | 73% | 11% | nd |
| Raji: Linfoma de células B | Día 1 | 24 días | 54% | 59% | nd | nd |
| PC3: próstata | Día 1 | 24 días | 88% | 90% | 42% | nd |

Valores = % de inhibición de crecimiento tumoral determinado a la terminación del estudio

nd = no determinado

REIVINDICACIONES:

1. Una molécula de unión aislada que compite por l unión a OX40R humano con un anticuerpo que comprende:
(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 7; y
(b) una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 8.

2. Una molécula de unión aislada que se une al OX40R humano, que comprende:
(a) una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1
(b) una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2; y
(c) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:3

3. Una molécula de unión aislada que se une a OX40R humano, que comprende:
(a) una CDR1 de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4;
(b) una CDR2 de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 5;
(c) una CDR3 de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 6.

4. Una molécula de unión aislada que se une al OX40R humano, que comprende:
(a) una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1,
(b) una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2,

(c) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3,
(d) una CDR1 de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4;
(e) una CDR2 de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 5; y
(f) una CDR3 de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 6.

5. Una molécula de unión aislada que se une al OX40R humano, que comprende:
(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 7; y
(b) una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 8.

6. Una molécula de unión aislada que se une al OX40R humano, que comprende:
(a) una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:13
(b) una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 14; y
(c) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 15.

7. Una molécula de unión aislada que se une al OX40R humano, que comprende:
(a) una CDR1 de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 16,
(b) una CDR2 de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 17; y
(c) una CDR3 de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 18.

8. Una molécula de unión aislada que se une al OX40R humano, que comprende:
(a) una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 13,
(b) una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 14,
(c) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 15,
(d) una CDR1 de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 16;
(e) una CDR2 de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 17; y
(f) una CDR3 de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 18.

9. Una molécula de unión aislada que se une al OX40R humano, que comprende:
(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 19; y
(b) una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 20.

10. Una molécula de unión aislada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 que:
(a) se une al OX40R humano con una $K_D$ de $1 \times 10^{-6}$ M o menos; y
(b) tiene actividad agonista sobre el OX40R humano.

11. La molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que es un anticuerpo humano.

12. La molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que es un anticuerpo

quimérico o humanizado.

13. El anticuerpo de la reivindicación 11, en donde el anticuerpo se une al OX40R humano con una $K_D$ de 100 nM o menos.

14. Un anticuerpo monoclonal humano aislado que se une al OX40R humano, que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 9 o SEC ID NO: 21.

15. Un anticuerpo monoclonal humano aislado que se une al OX40R humano, que comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 10 o SEC ID NO: 22.

16. Un anticuerpo monoclonal humano aislado que se une al OX40R humano, que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 9 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 10.

17. Un anticuerpo monoclonal humano aislado que se une al OX40R humano, que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 21 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 22.

18. Una composición que comprende una molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, y opcionalmente un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

19. Un método para tratar cáncer en un mamífero que lo necesita, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 17.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mamas, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón o cáncer hematológico.

21. Un método de prevenir cáncer en un mamífero que lo necesita, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 17.

22. Un método de aumentar la respuesta inmune en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 17.

23. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 - 22, en donde la molécula de unión es un anticuerpo humano.

24. El método de acuerdo con la reivindicación 23, en donde la molécula de unión es el anticuerpo humano de acuerdo con la reivindicación 16 o 17.

25. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una

molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 17.

26. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 25, que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de las SEC ID Nos: 11, 12, 23 o 24.

27. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 25 o reivindicación 26.

28. El vector de acuerdo con la reivindicación 27, que además comprende una secuencia de expresión control unida operativamente a la molécula de ácido nucleico.

29. Una célula huésped que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 27 o reivindicación 28.

30. Un método de inhibir el crecimiento de las células tumorales, que comprende poner en contacto las células tumorales con una molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17 o con una composición que comprende una molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde la molécula de unión es una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento de las células tumorales.

RESUMEN

La presente descripción proporciona moléculas de unión aisladas que se unen al OX40R humano, las moléculas de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos de las moléculas de unión, los vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleicos, las células huésped que contienen los vectores, los métodos de obtención de las moléculas de unión, las composiciones farmacéuticas que contienen las moléculas de unión, y los métodos de uso de las moléculas de unión o composiciones.

Figura 1a

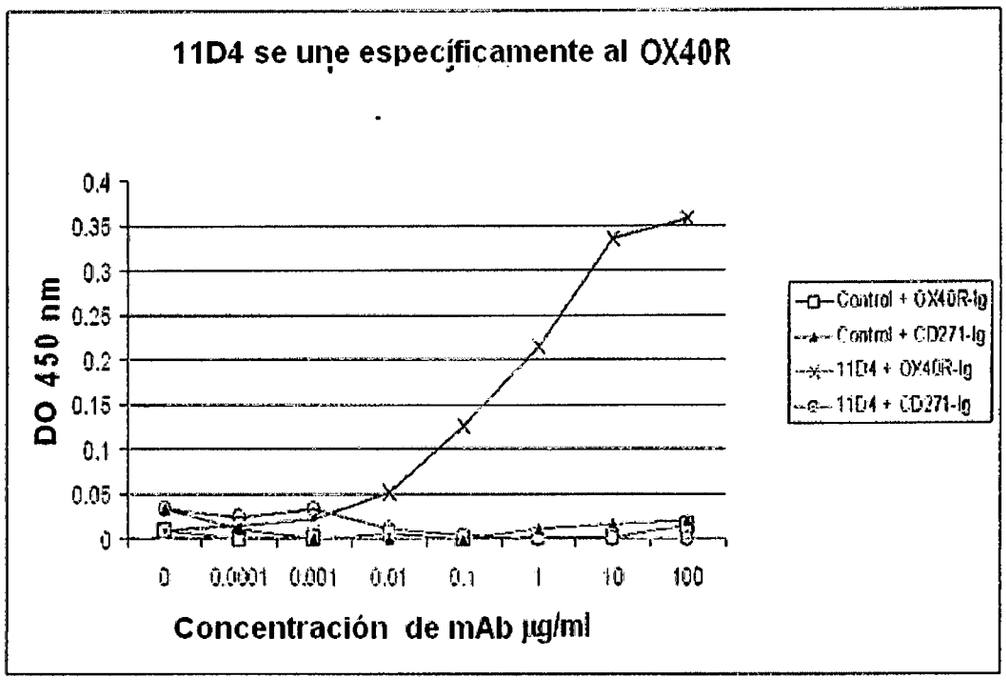



Figura 1b

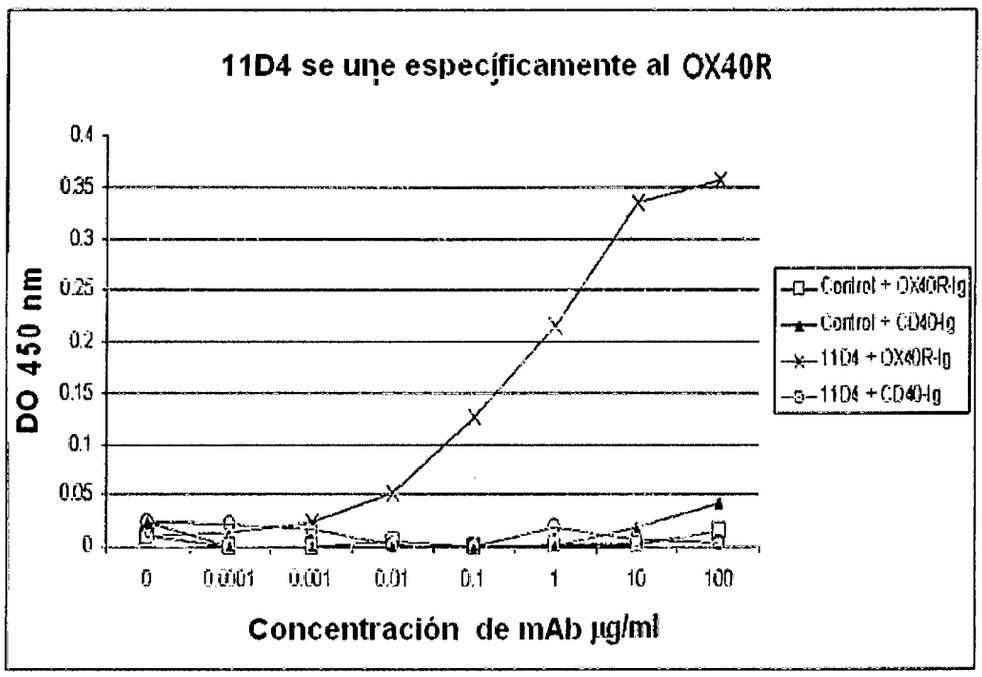


Figura 2

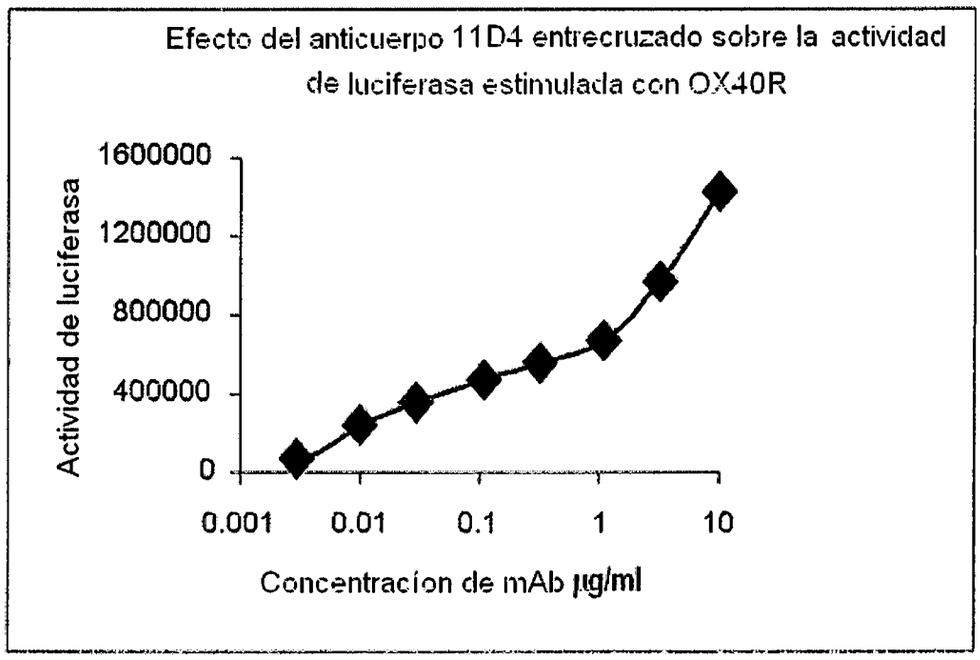



Figura 3

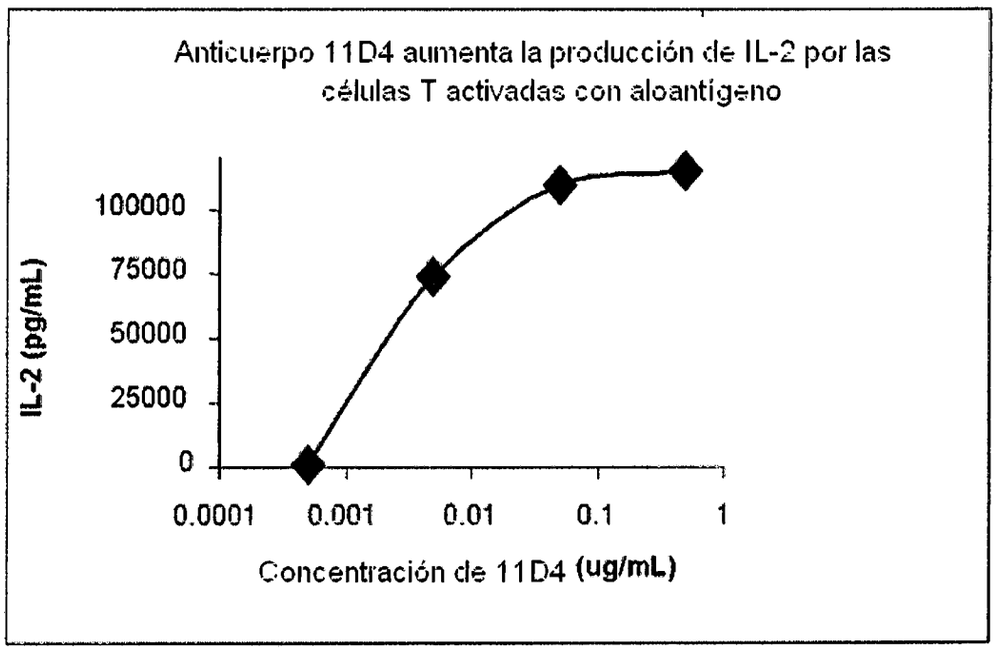


Figura 4

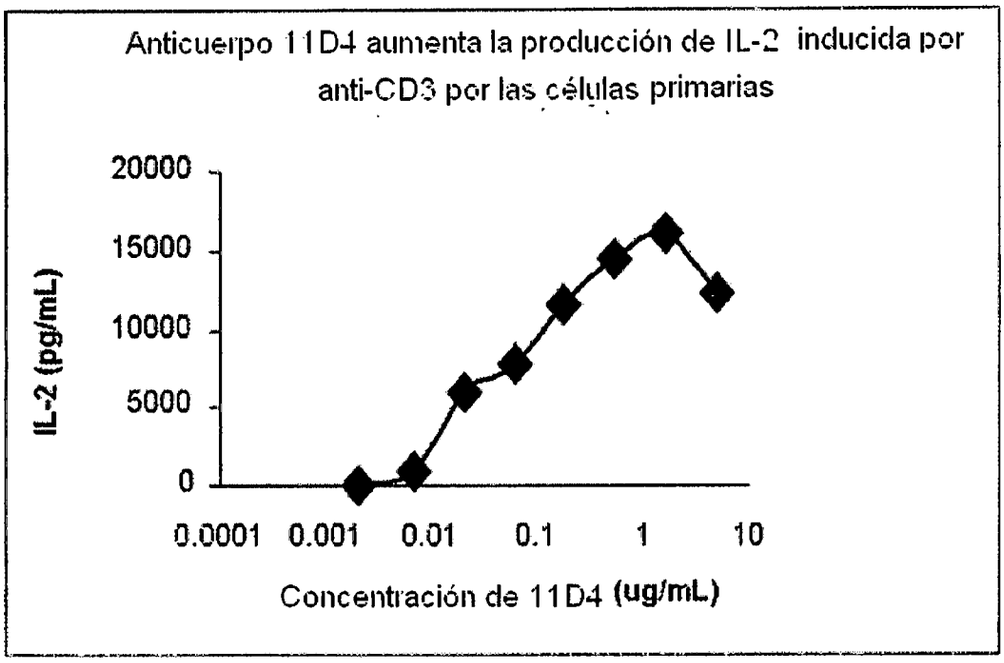



Figura 5

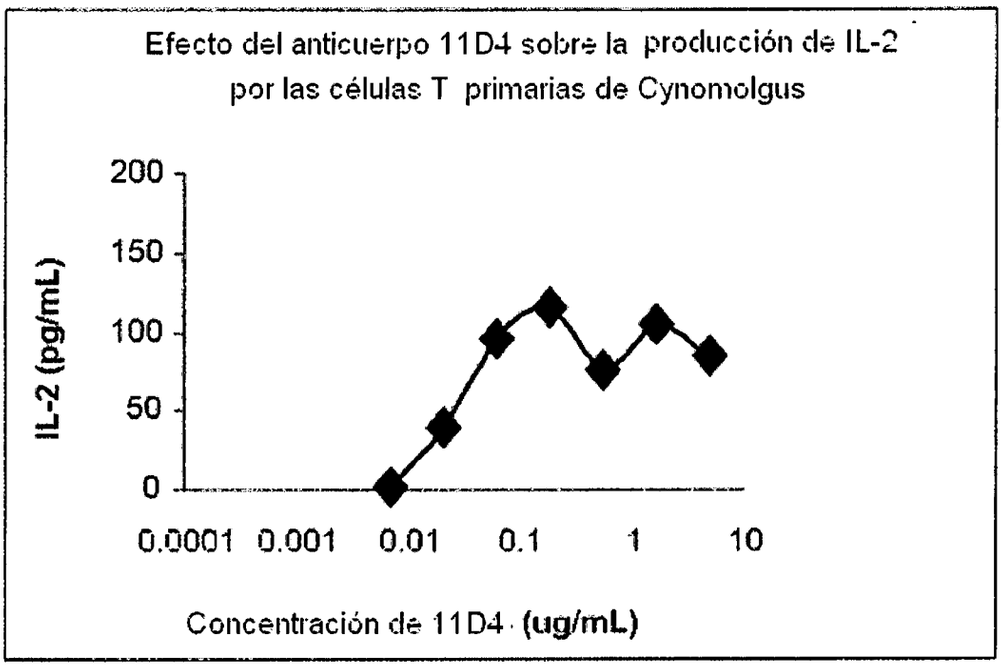


Figura 6

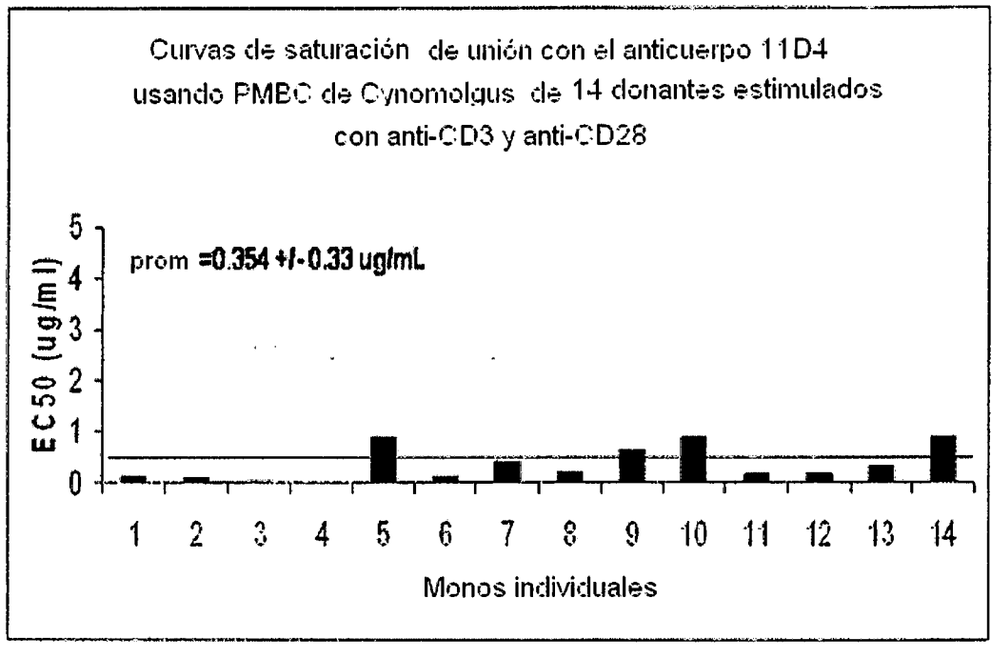



Figura 7

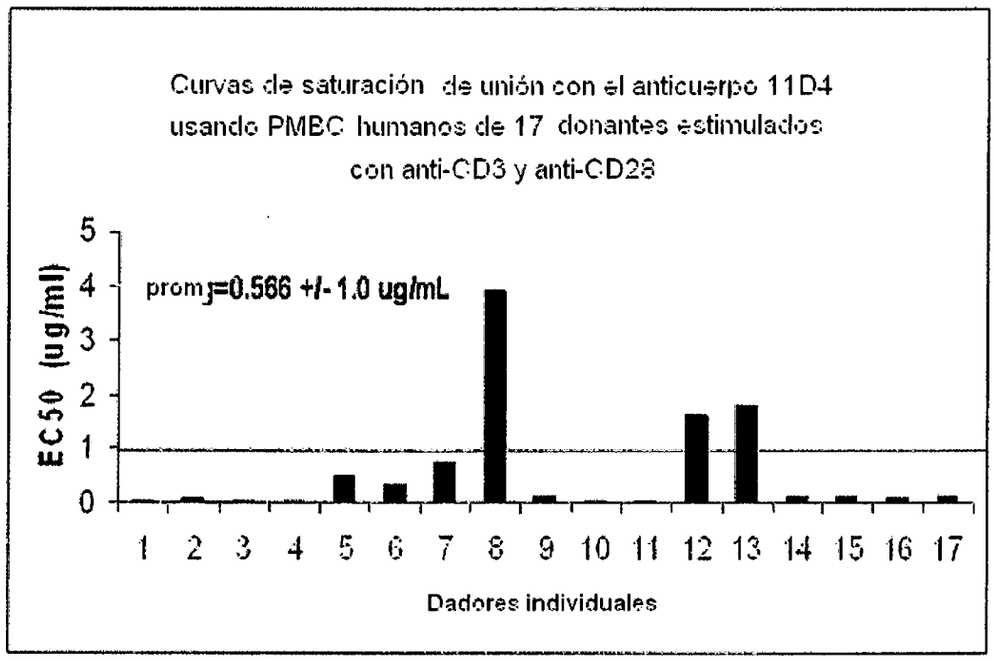


Figura 8

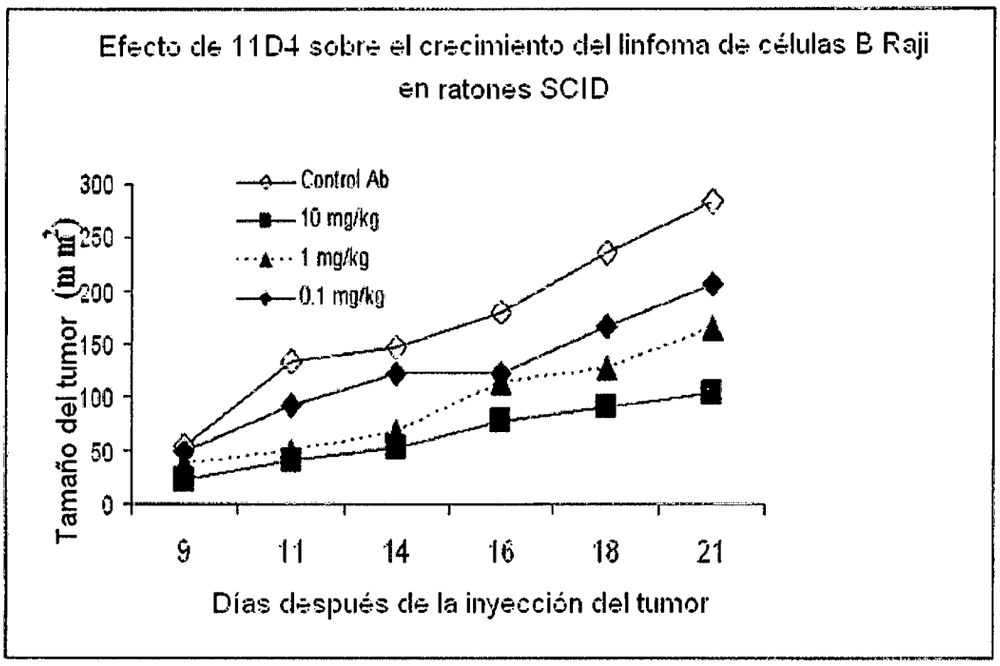



Figura 9

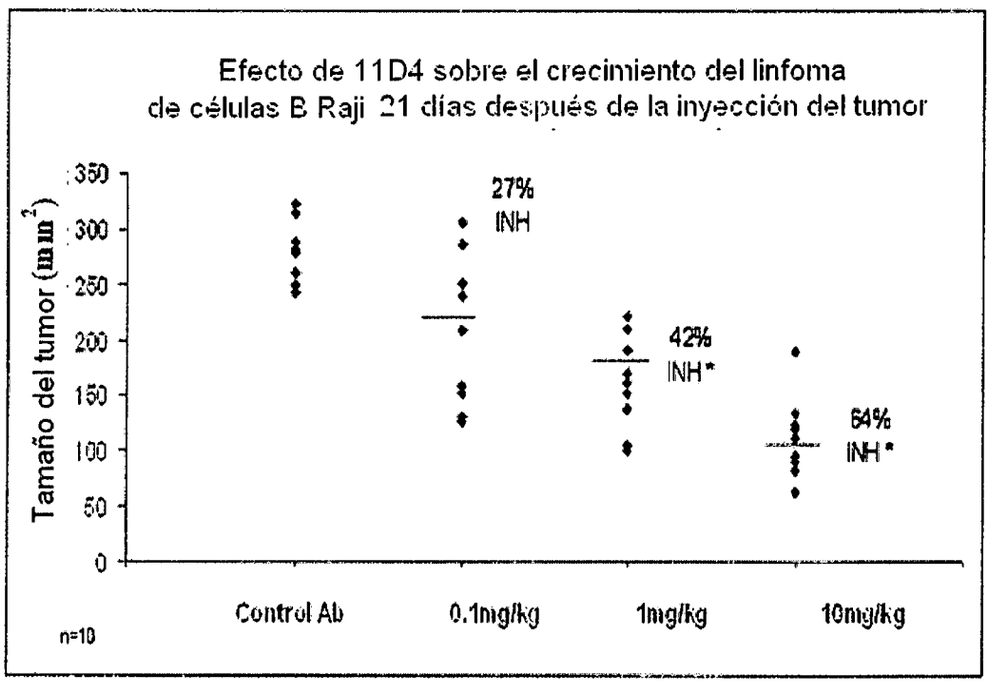


Figura 10

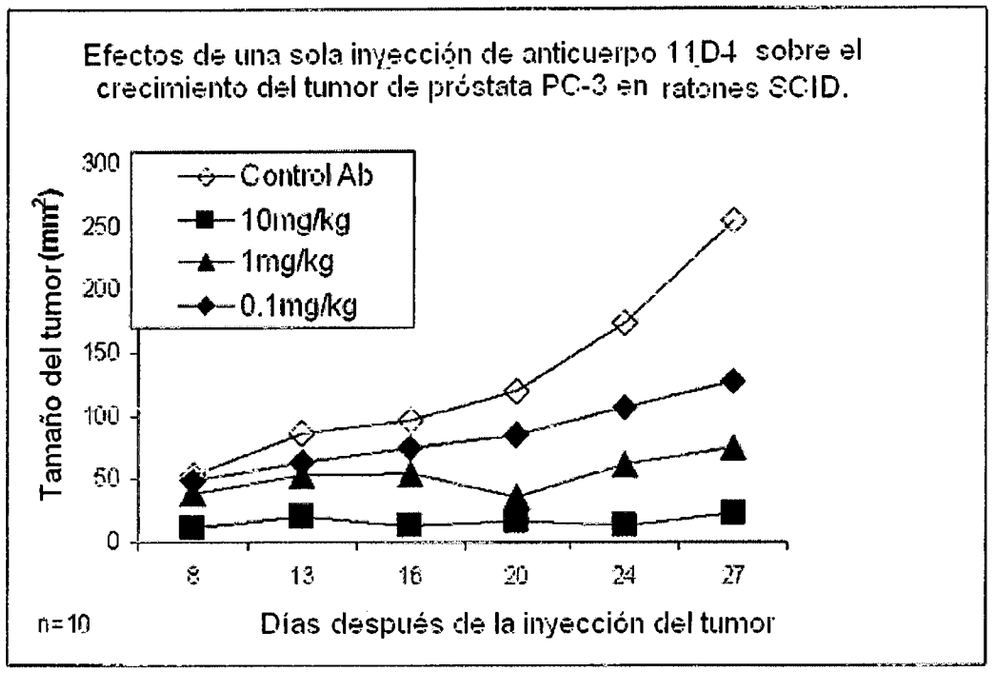



Figura 11

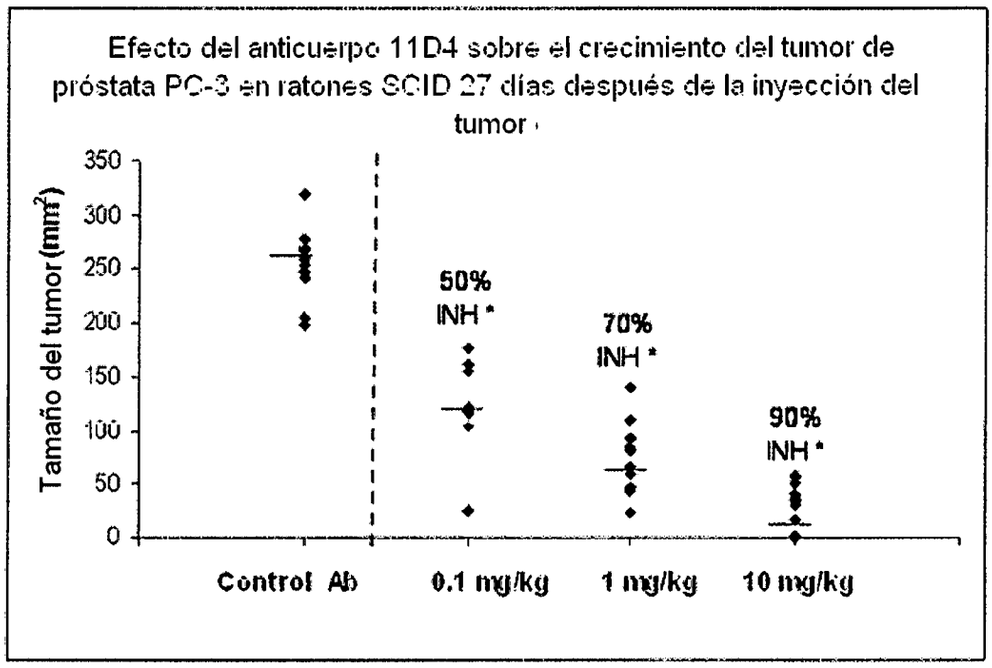


Figura 12

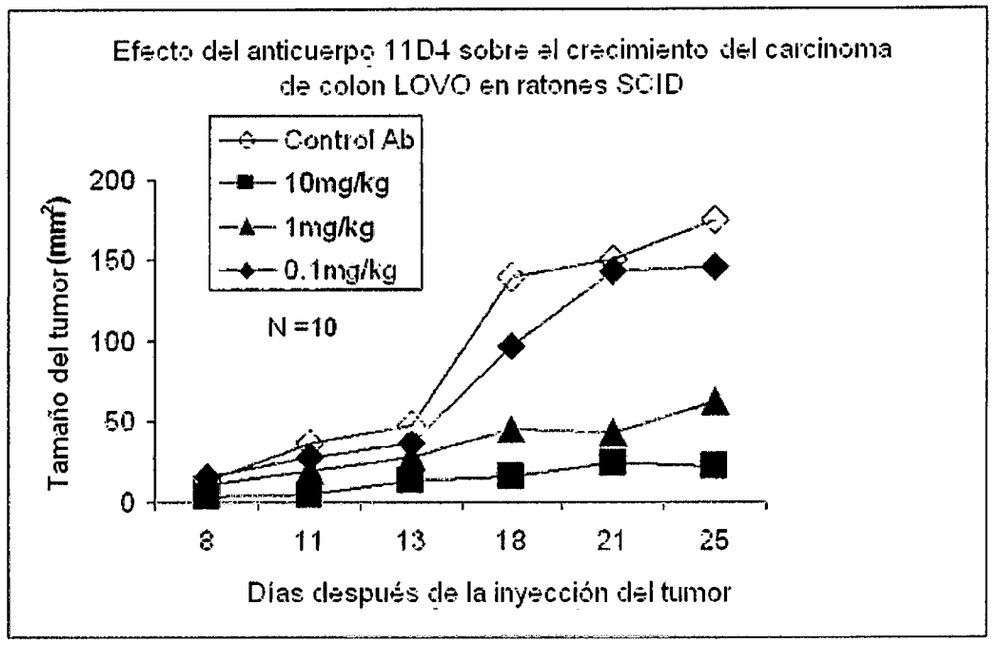



Figura 13

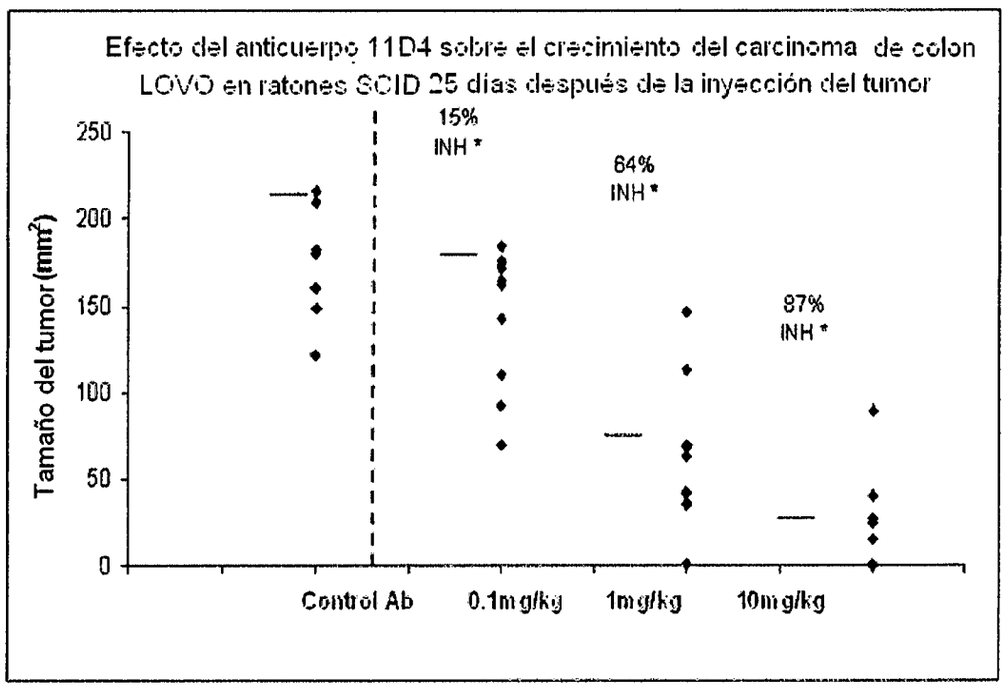


Figura 14

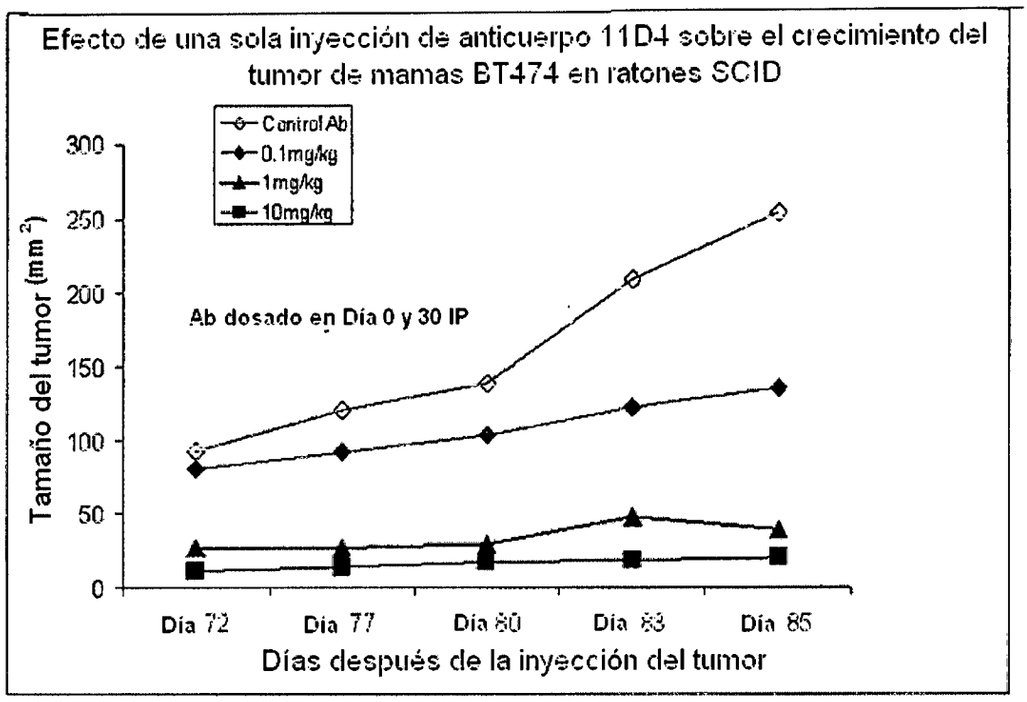
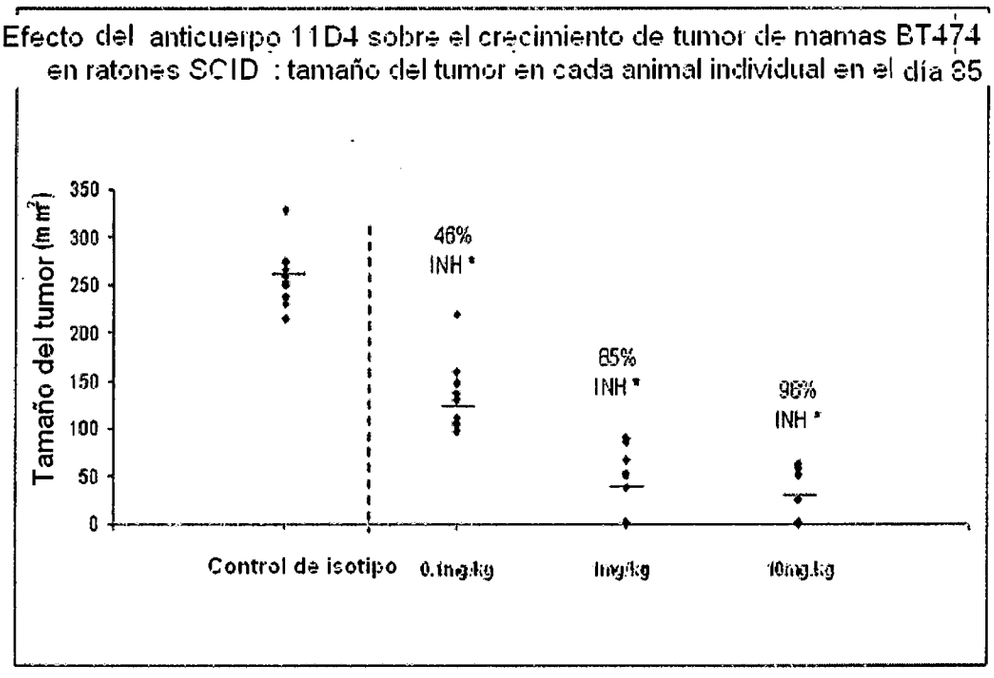



Figura 15



SEQUENCE LISTING

<110> Pfizer Inc. and Medarex Inc.

<120> BINDING MOLECULES TO THE HUMAN OX40 RECEPTOR

<130> PC33601

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Human

<400> 1

Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Human

<400> 2

Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 3

Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr
1 5

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Human

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Human

<400> 5

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 6

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 7
<211> 118
<212> PRT
<213> Human

<400> 7

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> Human

<400> 8

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 Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

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

<210> 9
<211> 444
<212> PRT
<213> Human

<400> 9

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 10
<211> 214
<212> PRT
<213> Human

<400> 10

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 Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 11
<211> 354
<212> DNA
<213> Human

<400> 11
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc cgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtagtagtac catagactac 180

gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctcactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agacgaggac acggctgtgt attattgtgc gagagaaagc 300

ggctggtacc tctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 12
<211> 321
<212> DNA
<213> Human

<400> 12
gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgtc gggcgagtca gggtattagc agctggttag cctggtatca gcagaaacca 120

gagaaagccc ctaagtccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt acctcccac tttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Human

<400> 13

Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Human

<400> 14

Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> Human

<400> 15

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

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Human

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Human

<400> 17

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> Human

<400> 18

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
1 5

<210> 19
<211> 124
<212> PRT
<213> Human

<400> 19

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

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

<210> 20
<211> 106
<212> PRT
<213> Human

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

<210> 21
<211> 450
<212> PRT
<213> Human

<400> 21

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

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

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

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

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
195 200 205

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
210 215 220

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 22
<211> 213
<212> PRT
<213> Human

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 23
<211> 372
<212> DNA
<213> Human

<400> 23
gaagtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120

ccagggaagg gcctggaatg ggtctcaggt attagttgga atagtggtag cataggctat 180

gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240

ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagatcag 300

agtacagctg attactactt ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 24
<211> 318
<212> DNA
<213> Human

<400> 24
gaaattgtgg tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgacgtt cggccaaggg 300

accaaggtgg aaatcaaa 318

# ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

# PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

BRADY, James, W.
Dickstein Shapiro LLP
1825 Eye Street, NW
Washington, DC 20006-5403
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
22 April 2010 (22.04.2010)

Applicant's or agent's file reference
M23480003PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2008/086417

International filing date *(day/month/year)*
11 December 2008 (11.12.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
MEDAREX, INC.
707 State Road
Princeton, NJ 08540
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
Route 206 & Province Line Rd.
Princeton, NJ 08540
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No. +41 22 338 87 20

Authorized officer
Ratsimba Landry-Andosoa
e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

# ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

# PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

BRADY, James, W.
Dickstein Shapiro LLP
1825 Eye Street, NW
Washington, DC 20006-5403
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

| Date of mailing *(day/month/year)* | |
|---|---|
| 29 April 2010 (29.04.2010) | |
| Applicant's or agent's file reference: M23480003PC | **IMPORTANT NOTIFICATION** |
| International application No.: PCT/US2008/086417 | International filing date *(day/month/year)*: 11 December 2008 (11.12.2008) |

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

| Name and Address | State of Nationality | State of Residence |
|---|---|---|
| LAIO, Wei<br>17143 Hillcrest Meadow Drive<br>Chesterfield, MO 63005<br>United States of America | US | US |
| | Telephone No. | |
| | Facsimile No. | |
| | E-mail address | |

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

| Name and Address | State of Nationality | State of Residence |
|---|---|---|
| LIAO, Wei<br>17143 Hillcrest Meadow Drive<br>Chesterfield, MO 63005<br>United States of America | US | US |
| | Telephone No. | |
| | Facsimile No. | |
| | E-mail address<br>☐ Notifications by e-mail authorized | |

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer<br>Deblue Natalia |
|---|---|
| Facsimile No. +41 22 338 87 20 | e-mail pt03.pct@wipo.int<br>Telephone No. +41 22 338 74 03 |

PATENT COOPERATION TREATY

# PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 42 and 44)

| Applicant's or agent's file reference | FOR FURTHER ACTION | see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below. |
|---|---|---|
| M32480003PC | | |
| International application No. | International filing date *(day/month/year)* | (Earliest) Priority Date *(day/month/year)* |
| PCT/US2008/086417 | 11/12/2008 | 14/12/2007 |
| Applicant | | |
| MEDAREX, INC. | | |

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:
      [X] the international application in the language in which it was filed
      [ ] a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. [ ] This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. [X] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [ ] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [ ] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
      [ ] as suggested by the applicant
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. [X] none of the figures is to be published with the abstract

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/086417

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material

   [X] a sequence listing

   [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   [X] on paper

   [X] in electronic form

   c. time of filing/furnishing

   [X] contained in the international application as filed

   [ ] filed together with the international application in electronic form

   [X] furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [X] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/086417

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | WO 03/106498 A (CRUCELL HOLLAND BV [NL]; BAKKER ALEXANDER BERTHOLD HEND [NL]; MEESTER-) 24 December 2003 (2003-12-24) page 22, last paragraph - page 29, paragraph 2 page 56, last paragraph - page 58, paragraph 1 page 60, paragraph 2 - page 61, paragraph 2 examples 1-10 claims 1-10,18-28 ----- | 1-30 |
| X | WO 99/42585 A (SISTERS OF PROVIDENCE IN OREGO [US]) 26 August 1999 (1999-08-26) example 8 claims 1-9 ----- -/-- | 1-30 |

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 24 April 2009 | 12/05/2009 |

| Name and mailing address of the ISA/ | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | Ulbrecht, Matthias |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | XIE F ET AL: "Characterization and application of two novel monoclonal antibodies against human OX40: costimulation of T cells and expression on tumor as well as normal gland tissues." TISSUE ANTIGENS APR 2006, vol. 67, no. 4, April 2006 (2006-04), pages 307-317, XP002525127 ISSN: 0001-2815 abstract page 313, right-hand column, paragraph 2 | 1-30 |
| X | KJAERGAARD J ET AL: "Therapeutic efficacy of OX-40 receptor antibody depends on tumor immunogenicity and anatomic site of tumor growth." CANCER RESEARCH 1 OCT 2000, vol. 60, no. 19, 1 October 2000 (2000-10-01), pages 5514-5521, XP007908325 ISSN: 0008-5472 abstract page 5515, left-hand column, paragraph 5 | 1-30 |
| X | KJAERGAARD J ET AL: "Augmentation versus inhibition: effects of conjunctional OX-40 receptor monoclonal antibody and IL-2 treatment on adoptive immunotherapy of advanced tumor." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) 1 DEC 2001, vol. 167, no. 11, 1 December 2001 (2001-12-01), pages 6669-6677, XP007908324 ISSN: 0022-1767 abstract page 6670, right-hand column, paragraph 4 | 1-30 |
| X | WEINBERG ANDREW D ET AL: "Anti-OX40 (CD134) administration to nonhuman primates: immunostimulatory effects and toxicokinetic study" JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, HAGERSTOWN, MD, US, vol. 29, no. 6, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 575-585, XP009115398 ISSN: 1524-9557 abstract | 1-30 |
| X | WO 2007/062245 A (KIRIN BREWERY [JP]; JOLLA INST ALLERGY IMMUNOLOG [US]; KATO SHINICHIRO) 31 May 2007 (2007-05-31) paragraph [0003] - paragraph [0018] claims 1,9,16,41,46-51 | 2-4,6-8, 11-13, 18,25, 27,28 |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/086417

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|---|---|---|---|---|
| WO 03106498 A | 24-12-2003 | AU | 2003257419 A1 | 31-12-2003 |
| | | CA | 2489004 A1 | 24-12-2003 |
| | | DE | 60317677 T2 | 30-10-2008 |
| | | EP | 1525223 A2 | 27-04-2005 |
| | | ES | 2295639 T3 | 16-04-2008 |
| | | NZ | 536746 A | 23-02-2007 |
| WO 9942585 A | 26-08-1999 | AP | 1261 A | 19-03-2004 |
| | | AT | 408011 T | 15-09-2008 |
| | | AU | 2873999 A | 06-09-1999 |
| | | CA | 2321161 A1 | 26-08-1999 |
| | | DK | 1060247 T3 | 26-01-2009 |
| | | EP | 1997893 A1 | 03-12-2008 |
| | | EP | 1060247 A1 | 20-12-2000 |
| | | ES | 2315008 T3 | 16-03-2009 |
| | | JP | 2002504334 T | 12-02-2002 |
| | | PT | 1060247 E | 22-12-2008 |
| WO 2007062245 A | 31-05-2007 | AU | 2006318329 A1 | 31-05-2007 |
| | | CA | 2631015 A1 | 31-05-2007 |
| | | CN | 101331150 A | 24-12-2008 |
| | | EP | 1951760 A2 | 06-08-2008 |
| | | KR | 20080080503 A | 04-09-2008 |

# PATENT COOPERATION TI . ATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

# PCT

## WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

| | |
|---|---|
| Applicant's or agent's file reference<br>see form PCT/ISA/220 | Date of mailing<br>*(day/month/year)* see form PCT/ISA/210 (second sheet)<br>**FOR FURTHER ACTION**<br>See paragraph 2 below |

| International application No. | International filing date *(day/month/year)* | Priority date *(day/month/year)* |
|---|---|---|
| PCT/US2008/086417 | 11.12.2008 | 14.12.2007 |

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/28 A61P35/00

Applicant
MEDAREX, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☑ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☑ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☑ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/210.

| Name and mailing address of the ISA: | Date of completion of this opinion | Authorized Officer |
|---|---|---|
| European Patent Office<br>D-80298 Munich<br>Tel. +49 89 2399 - 0<br>Fax: +49 89 2399 - 4465 | see form PCT/ISA/210 | Ulbrecht, Matthias<br>Telephone No. +49 89 2399-7710 |

**WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2008/086417

**Box No. I Basis of the opinion**

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

   ☑ the international application in the language in which it was filed

   ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

   a. type of material:

      ☒ a sequence listing

      ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material:

      ☒ on paper

      ☒ in electronic form

   c. time of filing/furnishing:

      ☒ contained in the international application as filed.

      ☐ filed together with the international application in electronic form.

      ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

4. ☑ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2008/086417

**Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

| | | | |
|---|---|---|---|
| Novelty (N) | Yes: | Claims | 1-30 |
| | No: | Claims | |
| Inventive step (IS) | Yes: | Claims | |
| | No: | Claims | 1-30 |
| Industrial applicability (IA) | Yes: | Claims | 1-30 |
| | No: | Claims | |

2. Citations and explanations

see separate sheet

**Box No. VIII Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re item V.

1. Cited documents

D1: WO 03/106498 A (CRUCELL HOLLAND BV [NL]; BAKKER ALEXANDER BERTHOLD HEND [NL]; MEESTER-) 24 December 2003 (2003-12-24)

D2: WO 99/42585 A (SISTERS OF PROVIDENCE IN OREGO [US]) 26 August 1999 (1999-08-26)

D3: XIE F ET AL: "Characterization and application of two novel monoclonal antibodies against human OX40: costimulation of T cells and expression on tumor as well as normal gland tissues." TISSUE ANTIGENS APR 2006, vol. 67, no. 4, April 2006 (2006-04), pages 307-317, XP002525127 ISSN: 0001-2815

D4: KJAERGAARD J ET AL: "Therapeutic efficacy of OX-40 receptor antibody depends on tumor immunogenicity and anatomic site of tumor growth." CANCER RESEARCH 1 OCT 2000, vol. 60, no. 19, 1 October 2000 (2000-10-01), pages 5514-5521, XP007908325 ISSN: 0008-5472

D5: KJAERGAARD J ET AL: "Augmentation versus inhibition: effects of conjunctional OX-40 receptor monoclonal antibody and IL-2 treatment on adoptive immunotherapy of advanced tumor." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 DEC 2001, vol. 167, no. 11, 1 December 2001 (2001-12-01), pages 6669-6677, XP007908324 ISSN: 0022-1767

D6: WEINBERG ANDREW D ET AL: "Anti-OX40 (CD134) administration to nonhuman primates: immunostimulatory effects and toxicokinetic study" JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, HAGERSTOWN, MD, US, vol. 29, no. 6, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 575-585, XP009115399 ISSN: 1524-9557

D7: WO 2007/062245 A (KIRIN BREWERY [JP]; JOLLA INST ALLERGY IMMUNOLOG [US]; KATO SHINICHIRO) 31 May 2007 (2007-05-31)

2. *Novelty (Art. 33(2) PCT):*

The prior art does not disclose any binding molecules specific for human OX40R which comprise any of the SEQ ID 1-10 and 13-22 or competes with any antibody as

defined in claim 1. Consequently, claims 1-30 are novel.

3. *Inventive step (Art. 33(3) PCT):*

D1 discloses agonist binding molecules, namely human antibodies capable of binding to and stimulating the human OX40-receptor, nucleic acid molecules encoding said binding molecules, vectors comprising said nucleic acid molecules as well as host cells comprising said vectors (p. 22, last para. - p. 29, para. 2; p. 56, last para. - p. 58, para. 1; p. 60, para. 2 - p. 61, para. 2; Examples 1-10; claims 1-10, 18-28). Said binding molecules are formulated into pharmaceutical compositions and used for stimulating T-cells and treating cancer, including breast cancer, colorectal cancer, lung cancer, prostate cancer and various haematological cancers. The binding molecules' affinities are at least $10^{-7}$ M. Claim 1 is distinguished from D1 in that the binding molecule has the property of competing with an antibody defined by specific sequences of the light and heavy chain variable domains. No other technical effect is imparted by this specificity. Thus, the proposed binding molecule is an alternative binding molecule specific for human OX40R to that disclosed in D1. The generation of such an alternative binding molecule, namely an antibody requires no more than routine methodology which is inter alia disclosed in D1. The selection of any specific binding molecule obtainable by said methodology, in the absence of any surprising technical effect has to be considered arbitrary and not sufficient to establish an inventive step. Hence, claim 1 is considered not inventive.

3.2 The foregoing considerations apply *mutatis mutandis* to claims 2-9 and 14-17 for which consequently an inventive step is denied as well.

3.3 The additional features suggested by any of the claims 11-13 are also disclosed in D1 (supra) and thus do not establish an inventive step.

3.4 Since D1 discloses the products related to the binding molecules i.e. pharmaceutical compositions comprising them, nucleic acids encoding them, vectors comprising said nucleic acids and host cells comprising said vectors as well as methods of enhancing immune responses and treating/preventing cancer (supra), claims 18-30 can derive

their inventivity merely from the binding molecules/antibodies referred to therein. These, for the reasons given under V.3.1 - V.3.3 however, are considered not inventive and consequently claims 18-30 fail to establish an inventive step as well.

3.5 A similar attack on inventive step of claims 1-30 could be established starting from any of D2-D6. D7 refers to antagonist anti-OX40R antibodies. Claims referring to binding molecules whose structural definition is not such to encompass only agonist antibodies (e.g. claims 1-3, 6 and 7), for the considerations elaborated under V.3.1 also lack an inventive step over D7.

4. *Industrial applicability (Art. 33(3) PCT):*

Industrial applicability of the subject-matter of claims 1-30 is acknowledged.

**Re item VIII.**

As concerns claims 19-24 and 30 it should be borne in mind that the patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

# INTERNAT. NAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/086417

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | WO 03/106498 A (CRUCELL HOLLAND BV [NL]; BAKKER ALEXANDER BERTHOLD HEND [NL]; MEESTER-) 24 December 2003 (2003-12-24) page 22, last paragraph - page 29, paragraph 2 page 56, last paragraph - page 58, paragraph 1 page 60, paragraph 2 - page 61, paragraph 2 examples 1-10 claims 1-10,18-28 | 1-30 |
| X | WO 99/42585 A (SISTERS OF PROVIDENCE IN OREGO [US]) 26 August 1999 (1999-08-26) example 8 claims 1-9 | 1-30 |

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 24 April 2009 | 12/05/2009 |

| Name and mailing address of the ISA/ | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Ulbrecht, Matthias |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | XIE F ET AL: "Characterization and application of two novel monoclonal antibodies against human OX40: costimulation of T cells and expression on tumor as well as normal gland tissues." TISSUE ANTIGENS APR 2006, vol. 67, no. 4, April 2006 (2006-04), pages 307-317, XP002525127 ISSN: 0001-2815 abstract page 313, right-hand column, paragraph 2. | 1-30 |
| X | KJAERGAARD J ET AL: "Therapeutic efficacy of OX-40 receptor antibody depends on tumor immunogenicity and anatomic site of tumor growth." CANCER RESEARCH 1 OCT 2000, vol. 60, no. 19, 1 October 2000 (2000-10-01), pages 5514-5521, XP007908325 ISSN: 0008-5472 abstract page 5515, left-hand column, paragraph 5 | 1-30 |
| X | KJAERGAARD J ET AL: "Augmentation versus inhibition: effects of conjunctional OX-40 receptor monoclonal antibody and IL-2 treatment on adoptive immunotherapy of advanced tumor." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 DEC 2001, vol. 167, no. 11, 1 December 2001 (2001-12-01), pages 6669-6677, XP007908324 ISSN: 0022-1767 abstract page 6670, right-hand column, paragraph 4 | 1-30 |
| X | WEINBERG ANDREW D ET AL: "Anti-OX40 (CD134) administration to nonhuman primates: immunostimulatory effects and toxicokinetic study" JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, HAGERSTOWN, MD, US, vol. 29, no. 6, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 575-585, XP009115398 ISSN: 1524-9557 abstract | 1-30 |
| X | WO 2007/062245 A (KIRIN BREWERY [JP]; JOLLA INST ALLERGY IMMUNOLOG [US]; KATO SHINICHIRO) 31 May 2007 (2007-05-31) paragraph [0003] - paragraph [0018] claims 1,9,16,41,46-51 | 2-4,6-8, 11-13, 18,25, 27,28 |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/086417

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|---|---|---|---|---|
| WO 03106493 A | 24-12-2003 | AU | 2003257419 A1 | 31-12-2003 |
| | | CA | 2489004 A1 | 24-12-2003 |
| | | DE | 60317677 T2 | 30-10-2008 |
| | | EP | 1525223 A2 | 27-04-2005 |
| | | ES | 2295639 T3 | 16-04-2008 |
| | | NZ | 536746 A | 23-02-2007 |
| WO 9942585 A | 26-08-1999 | AP | 1261 A | 19-03-2004 |
| | | AT | 408011 T | 15-09-2008 |
| | | AU | 2873999 A | 06-09-1999 |
| | | CA | 2321161 A1 | 26-08-1999 |
| | | DK | 1060247 T3 | 26-01-2009 |
| | | EP | 1997893 A1 | 03-12-2008 |
| | | EP | 1060247 A1 | 20-12-2000 |
| | | ES | 2315008 T3 | 16-03-2009 |
| | | JP | 2002504334 T | 12-02-2002 |
| | | PT | 1060247 E | 22-12-2008 |
| WO 2007062245 A | 31-05-2007 | AU | 2006318329 A1 | 31-05-2007 |
| | | CA | 2631015 A1 | 31-05-2007 |
| | | CN | 101331150 A | 24-12-2008 |
| | | EP | 1951760 A2 | 06-08-2008 |
| | | KR | 20080080503 A | 04-09-2008 |

# PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

# PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

To:
DICKSTEIN SHAPIRO LLP
Attn. Brady, James W.
1825 Eye Street NW
Washington DC 20006-5403
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

RECEIVED
Initials 1st
Initials 2nd
MAY 18 2009
JWB/EP
PCT/ISA/220
11/19 Mail Due

kwiktag® 032 097 087

| | |
|---|---|
| Applicant's or agent's file reference<br>MS24800003EC | Date of mailing *(day/month/year)*<br>12/05/2009<br>**FOR FURTHER ACTION** See paragraphs 1 and 4 below |
| International application No.<br>PCT/US2008/086417 | International filing date *(day/month/year)*<br>11/12/2008 |
| Applicant<br>MEDAREX, INC. | |

1. [x] The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

   **Filing of amendments and statement under Article 19:**
   The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

   **When?** The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

   **Where?** Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

   **For more detailed instructions,** see the notes on the accompanying sheet.

2. [ ] The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. [ ] **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

   [ ] the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

   [ ] no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Reminders**

   Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90*bis*.1 and 90*bis*.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

   The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 20 months from the priority date.

   Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

   In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

   See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

| | |
|---|---|
| Name and mailing address of the International Searching Authority<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL-2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer<br>Beatrix Tietze-Epoupa |

Form PCT/ISA/220 (October 2005) *(See notes on accompanying sheet)*

# NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

## INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 298).

**What parts of the international application may be amended?**

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

**When?** Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 48.1).

**Where not to file the amendments?**

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

**How?** Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

**The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.**

**What documents must/may accompany the amendments?**

**Letter (Section 205(b)):**

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

**The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.**

## NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped),whether

(i) the claim is unchanged;

(ii) the claim is cancelled;

(iii) the claim is new;

(iv) the claim replaces one or more claims as filed;

(v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

**The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:**

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."

2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."

3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 12 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."

4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1–10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

**"Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)**

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

**It must be in the language in which the international application is to be published.**

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

**Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed**

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement ) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

If a demand for international preliminary examination is made, the written opinion of the International Searching Authority will, except in certain cases where the International Preliminary Examining Authority did not act as International Searching Authority and where it has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b), be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority. If a demand is made, the applicant may submit to the International Preliminary Examining Authority a reply to the written opinion together, where appropriate, with amendments before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later (Rule 42*bis*.1(c)).

**Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase**

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-086027- -00000-0000
Fecha 2010-07-14 16:56:43 Dep 2020 DIR.NULVASCR
Tra 11 PATENTES Lve 378 FASENACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios 243

**PATENTE DE INVENCIÓN** ☐ **MODELO DE** ☐

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

**PATENTE DE INVENCIÓN PCT** ☑ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☑ Indicación que se solicita una PCT
- ☑ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☑ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

**DISEÑO INDUSTRIAL** ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

**ESQUEMA DE TRAZADO** ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
BRISTOL - MYERS SQUIBB COMPANY

| REFERENCIA | | |
|---|---|---|
| | Radicación No. | 10 086027 |
| | Solicitud internacional | PCT/US2008/086417 |
| | Fecha inicio fase nacional | 14/07/2010 |
| | Trámite | 11 |
| | Evento | 378 |
| | Actuación | 430 |
| | Oficio No. | 0 9 5 0 1 |

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe presentar un nuevo titulo que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el titulo relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal F) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título V de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continua en la página siguiente...

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

30 JUL 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha_____.
adpa11



Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5 , 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Cra 50 No. 26-55 Int. 2 Tel: 5300070
Call Center 6510240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
BRISTOL - MYERS SQUIBB COMPANY

| REFERENCIA | | |
|---|---|---|
| | Radicación No. | 10 086027 |
| | Solicitud internacional | PCT/US2008/086417 |
| | Fecha inicio fase nacional | 14/07/2010 |
| | Trámite | 11 |
| | Evento | 378 |
| | Actuación | 430 |
| | Oficio No. | 0 0 9 5 0 2 |

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del titulo primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

30 JUL 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha_____.
adpa11

**OLARTERAISBECK**
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

1

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACION

E. S.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-086027- -00003-0000
Fecha: 2010-09-24 16:39:57 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIVII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 444 RESPUESTAREQUE Folios: 82

**Re: Expediente N° 10-086.027**
**Solicitud de Patente de Invención "ANTICUERPOS MONOCLONALES O FRAGMENTOS DEL MISMO QUE SE UNEN AL RECEPTOR HUMANO OX40"**
**Solicitante: BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY y PFIZER INC.**
**Nuestra Ref: P2010/000074**

**RESPUESTA AL OFICIO N° 9501 NOTIFICADO POR FIJACION EN LISTA No. 262 DE FECHA 30 DE JULIO DE 2010, (EXAMEN DE FORMA ART 39)**

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad en referencia, me permito dar respuesta al auto proferido por ese Despacho, dentro del término legal previsto en el artículo 39 de la Decisión 486 en los siguientes términos:

1. En respuesta a la primera observación del Examinador me permito presentar un nuevo título: **"ANTICUERPOS MONOCLONALES O FRAGMENTOS DEL MISMO QUE SE UNEN AL RECEPTOR HUMANO OX40"**, el cual permite identificar claramente el objeto de la solicitud de patente según lo previsto en la Regla 4.3 PCT, Artículos 26 y 27 de la Decisión 486 y Circular Única de la SIC numeral 5.2.9.

248

2. En respuesta a la segunda observación del Examinador, me permito aportar junto al presente memorial dos (2) documentos de cesión debidamente legalizados, según los

artículos 259 y 260 del CPC, en los que consta la cesión de catorce (14) inventores al solicitante, según lo previsto en el Art. 26-k de la Decisión 486.

3. Finalmente, me permito adjuntar copia auténtica del poder a mi conferido por el solicitante **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**, según lo previsto en los Artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil.

Atentamente,

CARLOS R. OLARTE
CC. No. 79.782.747 de Bogotá
T.P. 74.295

Adjunto: Documentos de cesión
Copia auténtica del Poder de Bristol-Myers Squibb Company

*La certificación notarial adjunta lleva la firma y el sello de:*

"Julie M. Staszewski, Notario Público de New Jersey. Mi nombramiento vence el 13 de abril de 2014"

CERTIFICACIÓN

La suscrita, Vicepresidente Principal y Representante Legal de de Bristol-Myers Squibb Company, por medio del presente documento nombra a:

Briana G. Bergen
Nadine Flynn
Paul Golian
Warren Volles
Louis Wille
Anastasia Winslow

(a) para presentar a las oficinas gubernamentales de patentes, marcas registradas, derechos de autor y similares de todos los países o a cualquier autoridad competente, todas las solicitudes originales, divisionales, de continuación y reexpedición, peticiones y solicitudes en nombre de Bristol-Myers Squibb Company y sus compañías subsidiarias, de cartas de patente de inventos, modelos utilitarios, modelos industriales y diseños y mejoras de adiciones de los mismos, marcas registradas y derechos de autor (b) iniciar y proseguir oposiciones y apelaciones; (c) presentarse ante cualquier funcionario debidamente autorizado, ministro, oficina, secretarías y comisiones o comisionados que pueda ser necesario;

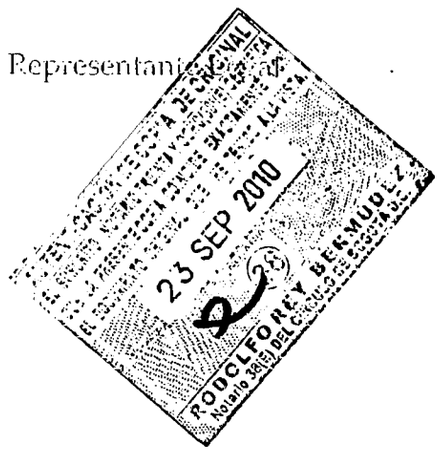
Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376-1993 Mindustria

(d) firmar y aprobar en nombre de esta compañía todos los documentos y poderes que puedan ser necesarios o deseables por parte de los individuos interesados para llevar a cabo los poderes aquí conferidos; (e) solicitar todos los procesos; (f) pagar o retirar todos los impuestos, obtener recibos para los mismos y obtener exoneraciones; (g) retirar solicitudes y todos los documentos relacionados con ellos; (h) iniciar procesos contra infractores y asegurar la defensa en juicios de infracción; y (i) en general hacer todo lo que en juicio de los individuos autorizados pueda necesitarse para asegurar el otorgamiento de los privilegios antes mencionados.

En constancia de lo anterior, he puesto mi firma y el sello de la compañía este día 2 de diciembre de 2008.

(Firmadlo) Sandra Leung, Vicepresidente Principal y Representante [illegible]

*Apostilla adjunta:*




Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Ministerio

5

APOSTILLA:
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

| | |
|---|---|
| 1. País: | Estados Unidos de América |
| | El presente documento público |
| 2. Ha sido firmado por: | Julie M Staszewski |
| 3. Actuando en calidad de: | Notario Público de New Jersey |
| 4. Lleva el sello/estampilla de: | Julie M. Staszewski , Notario |
| | Certificado |
| 5. En: | Trenton, New Jersey |
| 6. El: | 21 de junio de 2010 |
| 7. Por: | Andrew P. Sidamon-Eristoff, Tesorero del Estado |
| 8. Bajo el No.: | A397069 |
| 9. Sello / estampilla: | "El Gran Sello del Estado de New Jersey" |
| 10. Firma: | (Firmado) |

*Certificado No. 1174525710*
*Verifique este certificado por internet en:*
*https://www1.state.nj.us/TYTR-StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp*

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
2010 JUL 21 6:20

FIN DE LA TRADUCCIÓN

23 SEP 2010

Certificación:
Certifico que la presente es una traducción auténtica y completa del inglés al español del documento adjunto, la cual he elaborado según mi leal saber y entender.
Documento: "Bristol-Myers Squibb Company – Certificación"
Fecha: 13 de julio de 2010.
Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes (Sello y firma digital debidamente registrados ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia)
Licencia # 376 de 1993, expedida por el Ministerio de Justicia.
Dirección: Carrera 15 # 99-13 Of. 411, Bogotá, D.C.
Teléfonos: (571) 218 2308, (571) 623 2925.
E-mail: traseser1@yahoo.com
Traducción # 15-251

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

6

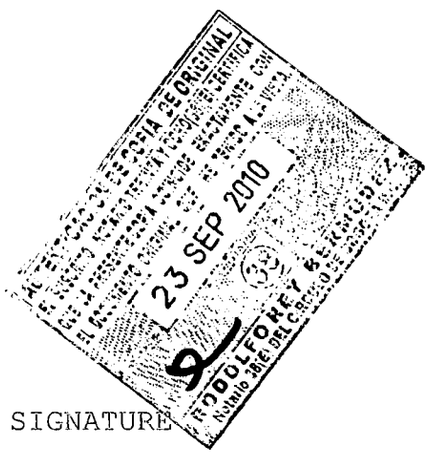
*APOSTILLE*

*(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)*

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
   JULIE M STASZEWSKI
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
   NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
   JULIE M STASZEWSKI, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 21ST DAY OF JUNE 2010
7. BY: Andrew P Sidamon-Eristoff
   State Treasurer
8. NO: A397069
9. SEAL/STAMP:




10. SIGNATURE




Certificate Number: 1174525710
Verify this certificate at
https://www1.state.nj.us/TYTR_StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp

# OLARTERAISBECK

OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Alexander Agudelo
Ángela Correa
Erika Rico
Carlos A. Parra
Gina Arias
Juan Felipe Acosta
Andrés Rincón
Mariana Franco
Monica Guevara
Alvaro Sabbagh

Of Counsel
Guillermo Chahín
Graciela Melo
Jacqueline Chaparro
Cruz E. de Moncaleano

The undersigned,

## General Power

El suscrito,

## Poder General

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**

domiciled in

domiciliado en

**Route 206 & Province Line Rd. Princeton, NJ 08540 United State of America**

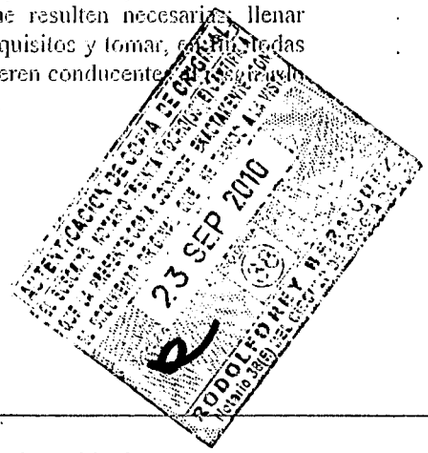
by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right, also to file Unfair competition actions and request injunctions in the Republic of Colombia, the Republic of Bolivia, the Republic of Ecuador, the Republic of Peru, and the Bolivarian Republic of Venezuela, to initiate before said authorities all the necessary actions to accomplish said purposes and to intervene in all instances, grades and procedural levels; to file and prosecute applications, declarations, complaints, to claim, counterclaim, answer claims and counterclaims; to draw up specifications; to make amendments; oppositions and all types of objections and writings of any nature; cancellations and administrative injunction proceedings; to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive documents and monies; act as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to request preliminary injunctions of any nature, settle, make arrangements, to submit to arbitrators, to desist from claims or procedures, to accept claims, to collect, to ratify legal proceedings subscribed before the appointment and/or presentation of this Power, substitute or delegate the legal representation and other acts prescribed by law, in short, with all such further powers as may be required; to comply with all other requirements and, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests.

nombramos por el presente a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro,** poder amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual y también para presentar acciones de competencia desleal y pedir medidas cautelares a nombre de la compañía en la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvenciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes a la defensa de nuestros intereses.

Signature/Firma: _____

Date/Fecha: June 14, 2010

City,Country/Ciudad,País: Princeton, New Jersey USA



MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

| **Notarial Certification** | **Certificación Notarial** |
|---|---|
| On this date,<br>June 14, 2010<br>The undersigned Notary Public certifies: | En esta fecha,<br>el Notario Público suscrito certifica: |
| 1. That<br>Paul D. Golian<br>of legal age and domiciled in<br>P.O. Box 4000, Princeton, New Jersey USA<br>signed the foregoing document. | 1. Que<br>mayor de edad y domiciliado<br>suscribió el documento que antecede. |
| 2. That the grantor has executed the foregoing document as Assistant General Counsel of **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY** | 2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de<br>de |
| 3. That **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY** having its principal place of business located in **Route 206 & Province Line Rd. Princeton, NJ 08540 United State of America** is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the General Power is granted are within the scope of its corporate purposes. | 4. Que<br>con sede principal ubicada en<br>está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social. |
| 4. That the grantor has the authority to execute the General Power and that his/her representation is legal. | 4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legitima. |
| 5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s): | 5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s): |

BMS Certification dated December 2, 2008

NOTARY PUBLIC (Signature):

**JULIE M. STASZEWSKI**
**Notary Public of New Jersey**
**My Commission Expires April 13, 2013**

23 SEP 2010

RODOLFO REY BERMUDEZ
Notario Público del Circuito de Bogotá D.C.

CERTIFICATION

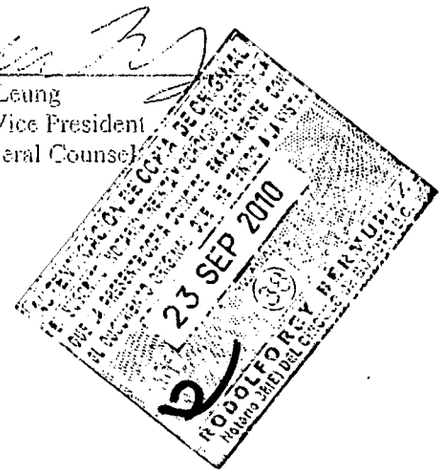
The undersigned, being the Senior Vice President and General Counsel of **Bristol-Myers Squibb Company,** hereby designates:

Briana C. Bergen
Nadine Flynn
Paul Golian
Warren Volles
Louis Wille
Anastasia Winslow

(a) to present to the Patent, Trademark, Copyright and similar Government Offices of all countries or to any competent authority, all original, divisional, continuation and reissue applications, petitions and requests in the name of Bristol-Myers Squibb Company and its subsidiary companies, for letters patent for inventions, utility models, industrial models and designs and improvements or additions thereof, trademarks and copyrights; (b) to initiate and prosecute oppositions and appeals; (c) to appear before all officers duly authorized, all Ministers, Bureaus, Clerk's Offices and Commissions or Commissioners that may be necessary; (d) to sign and approve on behalf of this corporation all documents and powers of attorney which judgment of the authorized individuals may be necessary or desirable to carry out the powers hereby conferred; (e) to request all proceedings; (f) to pay over or withdraw all taxes, obtain receipts therefor and give discharge; (g) to withdraw applications and all documents relating thereto; (h) to commence proceedings against infringers and assure the defense in infringement actions; and (i) generally to do all that in the judgment of the authorized individual may be necessary to secure granting of the privileges above-mentioned.

IN WITNESS WHEREOF, I have placed my hand and caused the seal of the Company to be affixed hereto on this 2nd day of December 2008.

Sandra Leung
Senior Vice President
and General Counsel



Traducción oficial de un documento que está originalmente en inglés

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

A TODOS QUIENES VIEREN EL PRESENTE DOCUMENTO:

Departamento de Comercio de los Estados Unidos

Oficina de Patentes y Marcas Registradas de los Estados Unidos

28 de junio de 2010

Se certifica que la copia anexa es una copia verdadera de los registros de esta oficina de un documento radicado el día 5 de febrero de 2009.

Por autoridad del Subsecretario de Comercio para la Propiedad Intelectual y Director de la Oficina de Patentes y Marcas Registradas de los Estados Unidos.

(Firmado) P. Swain - Funcionario que certifica.

Sello: "Departamento de Comercio, Oficina de Patentes y Marcas Registradas de los Estados Unidos"

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Resolución 376 - 1993 Minjusticia

CESIÓN DE PATENTE

Versión Electrónica v1.1
Versión de hoja de estilo v1.1

| | |
|---|---|
| Tipo de envío: | Nueva Cesión |
| Naturaleza de la transferencia: | Cesión |

Datos de las partes que realizan la transferencia

| Nombre | Fecha de ejecución |
|---|---|
| Peter Brams | 2 de febrero de 2009 |
| Brigitte Devaux | 4 de febrero de 2009 |
| Yi Wu | 2 de febrero de 2009 |
| Kristopher Toy | 30 de enero de 2009 |
| Heidi N. Le Blanc | 4 de febrero de 2009 |
| Haichun Huang | 2 de febrero de 2009 |
| Jing Min | 23 de diciembre de 2008 |
| Yanli Wu | 5 de enero de 2009 |
| Rory F. Finn | 5 de enero de 2009 |
| Barrett R. Thiele | 5 de enero de 2009 |
| Wei Liao | 5 de enero de 2009 |
| Ronald P. Gladue | 6 de enero de 2009 |
| Arvind Rajpal | 5 de enero de 2009 |
| Timothy J. Paradis | 6 de enero de 2009 |

Datos de las partes que reciben

| | |
|---|---|
| Nombre: | Medarex, Inc |
| Dirección: | 707 State Road |
| Ciudad: | Princeton |
| Estado/País: | New Jersey |
| Código postal: | 08540 |

| | |
|---|---|
| Nombre: | Pfizer Inc |
| Dirección: | 235 East 42nd Street |
| Ciudad: | New York |
| Estado/País: | New York |

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Resolución 376 - 1993 Minjusticia

| | |
|---|---|
| Código postal: | 10017 |

Número total de propiedades: 1

| Tipo de propiedad | Número |
|---|---|
| Número de la solicitud | 12332944 |

Datos para la correspondencia:

Número de Fax: (202) 420-2201

*La correspondencia será enviada por US Mail cuando el intento de hacerlo por fax no sea exitoso.*

Teléfono: 202-420-2200

E-mail: amosl@dsmo.com

Nombre del correspondiente: Dickstein Shapiro LLP

Dirección línea 1: 1825 Eye Street, NW

Dirección línea 4: Washington, DISTRICT OF COLUMBIA 20006

| | |
|---|---|
| Número del registro del Representante: | M3248.0003/P003 |
| Nombre del remitente: | Lisa J. Amos |

Total de anexos: 22
Fuente=m3248003Assigment#page1.tif
Fuente=m3248003Assigment#page2.tif
Fuente=m3248003Assigment#page3.tif
Fuente=m3248003Assigment#page4.tif
Fuente=m3248003Assigment#page5.tif
Fuente=m3248003Assigment#page6.tif
Fuente=m3248003Assigment#page7.tif
Fuente=m3248003Assigment#page8.tif
Fuente=m3248003Assigment#page9.tif
Fuente=m3248003Assigment#page10.tif
Fuente=m3248003Assigment#page11.tif
Fuente=m3248003Assigment#page12.tif
Fuente=m3248003Assigment#page13.tif
Fuente=m3248003Assigment#page14.tif
Fuente=m3248003Assigment#page15.tif
Fuente=m3248003Assigment#page16.tif
Fuente=m3248003Assigment#page17.tif
Fuente=m3248003Assigment#page18.tif
Fuente=m3248003Assigment#page19.tif
Fuente=m3248003Assigment#page20.tif
Fuente=m3248003Assigment#page21.tif
Fuente=m3248003Assigment#page22.tif

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

CESIÓN POR PARTE DE LOS INVENTORES

ESTA CESIÓN es realizada por Peter Brams, Brigitte Devaux, Yu Wu, Kristopher Toy, Heidi N. LeBlanc y Haichun Huang, todos con dirección postal en 521 Cottonwood Drive, Milpitas, California 95035 (quienes de ahora en adelante se denominarán los Cedentes);

PUESTO QUE los Cedentes han inventado ciertas mejoras nuevas y útiles con respecto a BINDING MOLECULES TO THE HUMAN OX40 RECEPTOR (Unión de moléculas al receptor humano OX40), presentadas en una solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos, ya radicada el 14 de diciembre de 2007, como Solicitud de los Estados Unidos No. 61/013,947, una solicitud de Patente para Cartas de Patente de los Estados Unidos, ya radicada el 11 de diciembre de 2008 como solicitud de los Estados Unidos No. 12/332,944 y una Solicitud de Patente Internacional ya radicada el 11 de diciembre de 2008 y una Solicitud de Patente Hondureña No.2008/1864 como PCT/US2008/086417 ( las que se denominarán colectivamente "Solicitudes"); y

PUESTO QUE MEDAREX, INC., una compañía organizada de acuerdo con las leyes de New Jersey, que tiene su sede comercial principal en 707 State Road, Princeton, New Jersey 08540 (de ahora en adelante denominada Cesionario), desea adquirir la totalidad del derecho, título e interés sobre dichos inventos y dichas Solicitudes, así como sobre toda Carta de Patente de los Estados Unidos y demás países que puedan obtenerse en el futuro sobre todo ello,

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

ENTONCES, POR LO TANTO, en consideración de un dólar ($1.00) y otra buena y suficiente consideración, de lo cual se está dando acuse de recibo por el presente, los Cedentes hemos vendido, transferido y traspasado y por el presente documento vendemos, cedemos, transferimos y traspasamos al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y Cesionarios la totalidad del derecho, titulo e interés sobre los inventos y Solicitudes de Carta de Patente antes mencionados, al igual que sobre todas las Solicitudes de división directa e indirecta, continuaciones y continuaciones parciales de dichas Solicitudes y cualquier Carta de Patente en los Estados Unidos y cualquier otro país, que puedan otorgarse sobre ellas, así como las reexpediciones, reexámenes y extensiones de dicha Carta de Patente, al igual que sobre todos los derechos establecidos en la Convención Internacional para la Protección de la Propiedad Industrial, incluyendo todos los derechos de prioridad para que sean poseídos y disfrutados por el Cesionarios, para su propio uso y beneficio y para el uso y beneficio de sus sucesores, representantes legales y cesionarios hasta la completa finalización de los términos para los cuales se hallan otorgado y/o prorrogado las Cartas de Patente, de forma tan total y completa como hubiera sido la posesión y el disfrute por parte de los Cedentes si esta venta y Cesión no se hubiese realizado.

Y por la misma consideración, los Cedentes se comprometen por el presente y garantizan al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios que, al momento de la ejecución y entrega de este documento, excepto por derechos, títulos y/o intereses que hayan surgido al Cesionario de acuerdo con la ley o que ya

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

hayan sido transferidos al Cesionario, los Cedentes son los propietarios legales de la totalidad del derecho, titulo e interés sobre los inventos y Solicitudes de Cartas de Patente antes mencionados y que los mismos no están gravados y que los Cedentes tienen buen y pleno derecho y autoridad legal para vender y transferir los mismos de la forma aquí presentada.

Y por la misma consideración, los Cedentes convienen y acuerdan por el presente con el Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, que los Cedentes firmarán todos los papeles y documentos, realizaran todas las declaraciones legales y harán todo lo que sea necesario o requerido para la consecución, mantenimiento, puesta en práctica y defensa de mis Cartas de Patente y solicitudes de Cartas de Patente para dichos inventos, sin costo para el Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, y cuando sea el caso que el abogado del Cesionario o el abogado de sus sucesores, representantes legales y cesionarios aconseje que cualquier procedimiento que esté en conexión con dichos inventos o dichas solicitudes de Cartas de Patente para dichos inventos en cualquier país, incluyendo pero no solamente interferencia de procedimientos, es legal y deseable; o que cualquier división, continuación o continuación parcial de cualquier solicitud de Cartas de Patente, o cualquier reexpedición, reexamen o prórroga de cualquier Carta de Patente para obtenerlas es legal y deseable.

Y los Cedentes solicitan por el presente al Comisionado de Patentes y Marcas Pegistradas que expidan dichas Cartas de Patente de los Estados Unidos al

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

Cesionario, como Cesionario de dichos inventos y que se expidan Cartas de Patente sobre ellas para uso y beneficio del Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios.

Y los Cedentes otorgan por el presente a las siguientes personas el poder para insertar en esta Cesión cualquier identificación adicional que sea necesaria o deseable con el propósito de cumplir con las normas de la Oficina de Patentes y Marcas Pegistradas de los Estados Unidos para el registro de este documento: (ilegible) profesionales en el Número de Cliente 24998.

Y los Cedentes reconocen una obligación de cesión de este invento al Cesionario en el momento en que se hizo el invento.

Patente
Rollo: 022213. Marco: 0222

---

Fecha: 2 de febrero de 2009.

(Firmado) Peter Brams

RECONOCIMIENTO

Estado de California

Condado de Santa Clara

El día 2 de febrero de 2009, ante mí, Nancy Lares Glynn, Notario Público, se presentó personalmente Peter Brams, quien me comprobó con evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre está suscrito al instrumento adjunto y reconoció ante mí que lo ejecutó como persona autorizada y que por su firma en

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

dicho instrumento, la persona o la entidad en nombre de la cual actuó, ejecutó el instrumento.

Certifico, consciente de la pena por perjurio según las leyes del Estado de California, que el anterior párrafo es verdadero y correcto.

En constancia de lo anterior, firmo y estampo el sello oficial.
(Firmado) / Nancy Lares Glynn / Notario Público

Sello: "Nancy Lares Glynn, Nombramiento #1654146. Notario Público de California, Condado de Santa Clara. Mi nombramiento vence el 25 de marzo de 2010".

Fecha: 4 de febrero de 2009.
(Firmado) Brigitte Devaux

RECONOCIMIENTO

Estado de California

Condado de Santa Clara

El día 4 de febrero de 2009, ante mí, Nancy Lares Glynn, Notario Público, se presentó personalmente Brigitte Devaux, quien me comprobó con evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre está suscrito al instrumento adjunto y reconoció ante mí que lo ejecutó como persona autorizada y que por su firma en dicho instrumento, la persona o la entidad en nombre de la cual actuó, ejecutó el instrumento.

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

Certifico, consciente de la pena por perjurio según las leyes del Estado de California, que el anterior párrafo es verdadero y correcto.

En constancia de lo anterior, firmo y estampo el sello oficial.

(Firmado) / Nancy Lares Glynn / Notario Público

Sello: "Nancy Lares Glynn, Nombramiento #1654146. Notario Público de California, Condado de Santa Clara. Mi nombramiento vence el 25 de marzo de 2010".

---

Fecha: 2 de febrero de 2009.

(Firmado) Yi Wu

RECONOCIMIENTO

Estado de California

Condado de Santa Clara

El día 2 de febrero de 2009, ante mí, Christopher P. Leach, Notario Público, se presentó personalmente Yi Wu, quien me comprobó con evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre está suscrito al instrumento adjunto y reconoció ante mí que lo ejecutó como persona autorizada y que por su firma en dicho instrumento, la persona o la entidad en nombre de la cual actuó, ejecutó el instrumento.

Certifico, consciente de la pena por perjurio según las leyes del Estado de California, que el anterior párrafo es verdadero y correcto.

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

En constancia de lo anterior, firmo y estampo el sello oficial.

(Firmado) Christopher R. Leach / Notario Público

Sello: "Christopher R. Leach, Nombramiento #1666772. Notario Público de California, Condado de San Mateo. Mi nombramiento vence el 25 de marzo de 2010".

---

Fecha: 30 de enero de 2009.

(Firmado) Kristopher Toy

RECONOCIMIENTO

Estado de California

Condado de Santa Clara

El día 30 de enero de 2009, ante mí, Nancy Lares Glynn, Notario Público, se presentó personalmente Kristopher Toy, quien me comprobó con evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre está suscrito al instrumento adjunto y reconoció ante mí que lo ejecutó como persona autorizada y que por su firma en dicho instrumento, la persona o la entidad en nombre de la cual actuó, ejecutó el instrumento.

Certifico, consciente de la pena por perjurio según las leyes del Estado de California, que el anterior párrafo es verdadero y correcto.

En constancia de lo anterior, firmo y estampo el sello oficial.

(Firmado) / Nancy Lares Glynn / Notario Público

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

Fecha: 4 de febrero de 2009.

(Firmado) Haichun Huang

RECONOCIMIENTO

Estado de California

Condado de Santa Clara

El día 4 de febrero de 2009, ante mí, Nancy Lares Glynn, Notario Público, se presentó personalmente Haichun Huang, quien me comprobó con evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre está suscrito al instrumento adjunto y reconoció ante mí que lo ejecutó como persona autorizada y que por su firma en dicho instrumento, la persona o la entidad en nombre de la cual actuó, ejecutó el instrumento.

Certifico, consciente de la pena por perjurio según las leyes del Estado de California, que el anterior párrafo es verdadero y correcto.

En constancia de lo anterior, firmo y estampo el sello oficial.

(Firmado) / Nancy Lares Glynn / Notario Público

Sello: "Nancy Lares Glynn, Nombramiento #1654146. Notario Público de California, Condado de Santa Clara. Mi nombramiento vence el 25 de marzo de 2010".

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
...ncia 376 - 1993 Minjusticia

Sello: "Nancy Lares Glynn, Nombramiento #1654146. Notario Público de California, Condado de Santa Clara. Mi nombramiento vence el 25 de marzo de 2010".

---

Fecha: 4 de febrero de 2009.

(Firmado) Heidi LeBlanc

RECONOCIMIENTO

Estado de California

Condado de Santa Clara

El día 4 de febrero de 2009, ante mí, Christopher R. Leach, Notario Público, se presentó personalmente Heidi LeBlanc, quien me comprobó con evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre está suscrito al instrumento adjunto y reconoció ante mí que lo ejecutó como persona autorizada y que por su firma en dicho instrumento, la persona o la entidad en nombre de la cual actuó, ejecutó el instrumento.

Certifico, consciente de la pena por perjurio según las leyes del Estado de California, que el anterior párrafo es verdadero y correcto.

En constancia de lo anterior, firmo y estampo el sello oficial.

(Firmado) Christopher R. Leach / Notario Público

Sello: "Christopher R. Leach, Nombramiento #1666772. Notario Público de California, Condado de San Mateo. Mi nombramiento vence el 25 de marzo de 2010".

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

Fecha: 4 de febrero de 2009.

(Firmado) Diana Hamlet-Cox
Vicepresidente y Abogado Jefe de Patentes
Número Directo: 408-545-2723
Medarex, Inc.
521 Cottonwood Drive
Milpitas, CA 95035
Constitución: Estado de New Jersey

RECONOCIMIENTO

Estado de California

Condado de Santa Clara

El día 4 de febrero de 2009, ante mí, Nancy Lares Glynn, Notario Público, se presentó personalmente ----------, quien me comprobó con evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre está suscrito al instrumento adjunto y reconoció ante mí que lo ejecutó como persona autorizada y que por su firma en dicho instrumento, la persona o la entidad en nombre de la cual actuó, ejecutó el instrumento.

Certifico, consciente de la pena por perjurio según las leyes del Estado de California, que el anterior párrafo es verdadero y correcto.

En constancia de lo anterior, firmo y estampo el sello oficial.

(Firmado) / Nancy Lares Glynn / Notario Público

Sello: "Nancy Lares Glynn, Nombramiento #1654146. Notario Público de California, Condado de Santa Clara. Mi nombramiento vence el 25 de marzo de 2010".

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 : 1993 Miniusticia

CESIÓN POR PARTE DE LOS INVENTORES

ESTA CESIÓN es realizada por Jing Min, Yanli Wu, Rory F. Finn, Barrett R. Thiele, Wei Liao, Ronald P. Gladue, Arvind Pajpal y Timothy J. Paradis, (quienes de ahora en adelante se denominarán los Cedentes), residentes en 15309 Nooning Tree Court, Chesterfield, Missouri 63017; 1352 Kiefer Bluffs Drive, Ballvin, Missouri 63021; 976 Sunburst Court, Manchester, Missouri 63021, 5619 Dantonaire Place, Saint Louis, Missouri 63128; 17143 Hillcrest Meadow Drive, Chesterfield, Missouri 63005; 83 Rowley Drive, Stonington, Connecticut 06378; 519 Foerster Street, San Francisco, California 94127; y 5 Beaver River Road, Richmond, Rhode Island 02892 respectivamente;

PUESTO QUE los Cedentes han inventado ciertas mejoras nuevas y útiles con respecto a BINDING MOLECULES TO THE HUMAN OX40 RECEPTOR (Unión de moléculas al receptor humano OX40), presentadas en una solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos, ya radicada el 14 de diciembre de 2007, como Solicitud de los Estados Unidos No. 61/013,947, una solicitud de Patente para Cartas de Patente de los Estados Unidos, ya radicada el 11 de diciembre de 2008 como solicitud de los Estados Unidos No. 12/332,944 y una Solicitud de Patente Internacional ya radicada el 11 de diciembre de 2008 y una Solicitud de Patente Hondureña No.2008/1864 como PCT/US2008/086417 (las que se denominarán colectivamente "Solicitudes"); y

PUESTO QUE Pfizer Inc., una compañía organizada de acuerdo con las leyes de Delaware, que tiene su sede comercial principal en 235 East 42nd Street, New York,

Traductor Oficial 220
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

NY 10017, (de ahora en adelante denominada Cesionario), desea adquirir la totalidad del derecho, título e interés sobre dichos inventos y dichas Solicitudes, así como sobre toda Carta de Patente de los Estados Unidos y demás países que puedan obtenerse en el futuro sobre todo ello,

ENTONCES, POR LO TANTO, en consideración de un dólar ($1.00) y otra buena y suficiente consideración, de lo cual se está dando acuse de recibo por el presente, los Cedentes hemos vendido, transferido y traspasado y por el presente documento vendemos, cedemos, transferimos y traspasamos al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y Cesionarios la totalidad del derecho, titulo e interés sobre los inventos y Solicitudes de Carta de Patente antes mencionados, al igual que sobre todas las Solicitudes de división directa e indirecta, continuaciones y continuaciones parciales de dichas Solicitudes y cualquier Carta de Patente en los Estados Unidos y cualquier otro país, que puedan otorgarse sobre ellas, así como las reexpediciones, reexámenes y extensiones de dicha Carta de Patente, al igual que sobre todos los derechos establecidos en la Convención Internacional para la Protección de la Propiedad Industrial, incluyendo todos los derechos de prioridad para que sean poseídos y disfrutados por el Cesionarios, para su propio uso y beneficio y para el uso y beneficio de sus sucesores, representantes legales y cesionarios hasta la completa finalización de los términos para los cuales se hallan otorgado y/o prorrogado las Cartas de Patente, de forma tan total y completa como hubiera sido la posesión y el disfrute por parte de los Cedentes si esta venta y Cesión no se hubiese realizado.

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

Y por la misma consideración, los Cedentes se comprometen por el presente y garantizan al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios que, al momento de la ejecución y entrega de este documento, excepto por derechos, títulos y/o intereses que hayan surgido al Cesionario de acuerdo con la ley o que ya hayan sido transferidos al Cesionario, los Cedentes son los propietarios legales de la totalidad del derecho, titulo e interés sobre los inventos y Solicitudes de Cartas de Patente antes mencionados y que los mismos no están gravados y que los Cedentes tienen buen y pleno derecho y autoridad legal para vender y transferir los mismos de la forma aquí presentada.

Y por la misma consideración, los Cedentes convienen y acuerdan por el presente con el Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, que los Cedentes firmarán todos los papeles y documentos, realizaran todas las declaraciones legales y harán todo lo que sea necesario o requerido para la consecución, mantenimiento, puesta en práctica y defensa de mis Cartas de Patente y solicitudes de Cartas de Patente para dichos inventos, sin costo para el Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, y cuando sea el caso que el abogado del Cesionario o el abogado de sus sucesores, representantes legales y cesionarios aconseje que cualquier procedimiento que esté en conexión con dichos inventos o dichas solicitudes de Cartas de Patente para dichos inventos en cualquier país, incluyendo pero no solamente interferencia de procedimientos, es legal y deseable; o que cualquier división, continuación o continuación parcial de cualquier solicitud de Cartas de Patente, o cualquier reexpedición, reexamen o prórroga de cualquier Carta de Patente para obtenerlas es legal y deseable.

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

Y los Cedentes solicitan por el presente al Comisionado de Patentes y Marcas Registradas que expidan dichas Cartas de Patente de los Estados Unidos al Cesionario, como Cesionario de dichos inventos y que se expidan Cartas de Patente sobre ellas para uso y beneficio del Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios.

Y los Cedentes otorgan por el presente a las siguientes personas el poder para insertar en esta Cesión cualquier identificación adicional que sea necesaria o deseable con el propósito de cumplir con las normas de la Oficina de Patentes y Marcas Registradas de los Estados Unidos para el registro de este documento: (ilegible) profesionales en el Número de Cliente 24998.

Y los Cedentes reconocen una obligación de cesión de este invento al Cesionario en el momento en que se hizo el invento.

Patente
Rollo: 022213. Marco: 0222

(Firmado) Jing Min
Fecha: 23 de diciembre de 2008.

Estados Unidos de América
Estado de Missouri
Condado de St Louis
El día 23 de diciembre de 2008, ante mí se presentó Jing Min, a quien conozco como la persona descrita en el anterior documento y quien la ejecutó y reconoció haberlo hecho.

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

(Firmado) Notario Público

Sello: "Jean L. Kelemen, Notario Público. Sello notarial. Estado de Missouri. Nombrado para el Condado de St. Charles. Mi nombramiento vence el 2 de junio de 2012. Nombramiento #08381218".

---

(Firmado) Yanli Wu
Fecha: 5 de enero de 2009.

Estados Unidos de América
Estado de Missouri
Condado de St Louis
El día 5 de enero de 2009, ante mí se presentó Yanli Wu, a quien conozco como la persona descrita en el anterior documento y quien la ejecutó y reconoció haberlo hecho.

(Firmado) Notario Público

Sello: "Jean L. Kelemen, Notario Público. Sello notarial. Estado de Missouri. Nombrado para el Condado de St. Charles. Mi nombramiento vence el 2 de junio de 2012. Nombramiento #08381218".

---

(Firmado) Rory F. Finn
Fecha: 5 de enero de 2009.

Estados Unidos de América
Estado de Missouri
Condado de St Louis

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

El día 5 de enero de 2009, ante mí se presentó Rory F. Finn, a quien conozco como la persona descrita en el anterior documento y quien la ejecutó y reconoció haberlo hecho.

(Firmado) Notario Público

Sello: "Jean L. Kelemen, Notario Público. Sello notarial. Estado de Missouri. Nombrado para el Condado de St. Charles. Mi nombramiento vence el 2 de junio de 2012. Nombramiento #08381218".

(Firmado) Barrett R. Thiele
Fecha: 5 de enero de 2009.

Estados Unidos de América

Estado de Missouri

Condado de St Louis

El día 5 de enero de 2009, ante mí se presentó Barrett R. Thiele, a quien conozco como la persona descrita en el anterior documento y quien la ejecutó y reconoció haberlo hecho.

(Firmado) Notario Público

Sello: "Jean L. Kelemen, Notario Público. Sello notarial. Estado de Missouri. Nombrado para el Condado de St. Charles. Mi nombramiento vence el 2 de junio de 2012. Nombramiento #08381218".

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

(Firmado) Wei Liao

Fecha: 5 de enero de 2009.

Estados Unidos de América

Estado de MO

Condado de St Louis

El día 5 de enero de 2009, ante mí se presentó Wei Liao, a quien conozco como la persona descrita en el anterior documento y quien la ejecutó y reconoció haberlo hecho.

(Firmado) Notario Público

Sello: "Krayle Lutke, Notario Público. Sello notarial. Estado de Missouri. Condado de St. Louis. Mi nombramiento vence el 15 de noviembre de 2012. Nombramiento #08632354".

---

(Firmado) Ronald P. Gladue

Fecha: 6 de enero de 2009.

Estados Unidos de América

Estado de Connecticut SS: Groton

Condado de New London

El día 6 de enero de 2009, ante mí se presentó Ronald P. Gladue, a quien conozco como la persona descrita en el anterior documento y quien la ejecutó y reconoció haberlo hecho.

(Firmado) Notario Público

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

Sello: "Stephanie A. Brodeur, Notario Público. Mi nombramiento vence el 31 de diciembre de 2009".

Fecha: 5 de enero de 2009.

(Firmado) Arvind Rajpal

RECONOCIMIENTO

Estado de California

Condado de San Mateo

El día 5 de enero de 2009, ante mí, Brigitte Oligher, Notario Público, se presentó personalmente Arvind Rajpal, quien me comprobó con evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre está suscrito al instrumento adjunto y reconoció ante mí que lo ejecutó como persona autorizada y que por su firma en dicho instrumento, la persona o la entidad en nombre de la cual actuó, ejecutó el instrumento.

Certifico, consciente de la pena por perjurio según las leyes del Estado de California, que el anterior párrafo es verdadero y correcto.

En constancia de lo anterior, firmo y estampo el sello oficial.

(Firmado) /Brigitte Oligher/ Notario Público

Sello: "Brigitte Oligher, Nombramiento #1690388. Notario Público de California, Condado de San Mateo. Mi nombramiento vence el 28 de agosto de 2010".

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

(Firmado) Timothy J. Paradis

Fecha: 6 de enero de 2009.

Estados Unidos de América

Estado de Connecticut SS: Groton

Condado de New London

El día 6 de enero de 2009, ante mí se presentó Timothy J. Paradis , a quien conozco como la persona descrita en el anterior documento y quien la ejecutó y reconoció haberlo hecho.

(Firmado) Notario Público

Sello: "Stephanie A. Brodeur, Notario Público. Mi nombramiento vence el 31 de diciembre de 2009".

---

Fecha: 21 de enero de 2009.

Pfizer Inc.

(Firmado) Nombre: Peter C. Richardson

Cargo: Subsecretario

Sello: "(Estado de New York, Condado de New York)

Suscrito y juramentado ante mí, este día 21 de enero de 2009".

Sello: "(Firmado) Annette D Cromer, Notario Público, Estado de New York. No. 01CR6194598. Certificado radicado en el Condado de New York. Mi nombramiento vence el 6 de octubre de 2012".

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Ministerio

*Apostilla adjunta:*

APOSTILLA:

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

| | |
|---|---|
| 1. País: | Estados Unidos de América |
| | El presente documento público |
| 2. Ha sido firmado por: | P. Swain |
| 3. Actuando en calidad de: | Funcionario de Certificación |
| 4. Lleva el sello/estampilla de: | Patentes y Marcas Registradas de Estados Unidos |
| | Certificado |
| 5. En: | Washington D.C. |
| 6. El: | Día nueve de agosto de 2010 |
| 7. Por: | Funcionario Asistente de Autenticaciones, Departamento de Estado, Estados Unidos |
| 8. Bajo el No.: | 10037872-5 |
| 9. Sello / estampilla: | = |
| 10. Firma: | (Firmado) Fernesia T. Crawford |

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
OFICINA DE LEGALIZACIONES BOGOTA D.C.
2010 SET -7 P 2:04
22961
CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO ESTAMPADA LAS FUNCIONES INDICADAS
NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

*FIN DE LA TRADUCCIÓN*

Certificación:
Certifico que la presente es una traducción auténtica y completa del inglés al español del documento adjunto, la cual he elaborado según mi leal saber y entender.
Documento: "Pfizer Inc. – Nueva Cesión"
Fecha: 25 de agosto 2010.
Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes (Sello y firma digital debidamente registrados ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia)
Licencia # 376 de 1993, expedida por el Ministerio de Justicia.
Dirección: Carrera 15 # 99-12 Of. 411, Bogotá, D.C.
Teléfonos: (571) 218 2308, (571) 623 2925.
E-mail: treseser1@yahoo.com
Traducción # 15-397

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

# APOSTILLE

*(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)*

1. Country: *United States of America*

This public document

2. has been signed by P. Swain

3. acting in the capacity of Certify Officer

4. bears the seal/stamp of U. S. Patent and Trademark Office

**Certified**

5. at Washington, D.C.

6. the ninth of August, 2010

7. by *Assistant Authentication Officer, United States Department of State*

8. No. 10037872-5

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Fernesia T. Crawford

A 7266359

# THE UNITED STATES OF AMERICA

## TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

**UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE**
**United States Patent and Trademark Office**

**June 28, 2010**

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON FEBRUARY 05, 2009.**

**By Authority of the**
**Under Secretary of Commerce for Intellectual Property**
**and Director of the United States Patent and Trademark Office**

**P. SWAIN**
**Certifying Officer**

# PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

| | |
|---|---|
| SUBMISSION TYPE: | NEW ASSIGNMENT |
| NATURE OF CONVEYANCE: | ASSIGNMENT |

CONVEYING PARTY DATA

| Name | Execution Date |
|---|---|
| Peter Brams | 02/02/2009 |
| Brigitte Devaux | 02/04/2009 |
| Yi Wu | 02/02/2009 |
| Kristopher Toy | 01/30/2009 |
| [illegible]di N. LeBlanc | 02/04/2009 |
| [illegible]chun Huang | 02/02/2009 |
| Jing Min | 12/23/2008 |
| Yanli Wu | 01/05/2009 |
| Rory F. Finn | 01/05/2009 |
| Barrett R. Thiele | 01/05/2009 |
| Wei Liao | 01/05/2009 |
| Ronald P. Gladue | 01/06/2009 |
| Arvind Rajpal | 01/05/2009 |
| Timothy J. Paradis | 01/06/2009 |

RECEIVING PARTY DATA

| | |
|---|---|
| Name: | Medarex, Inc. |
| [illegible]et Address: | 707 State Road |
| City: | Princeton |
| State/Country: | NEW JERSEY |
| Postal Code: | 08540 |

| | |
|---|---|
| Name: | Pfizer Inc. |
| Street Address: | 235 East 42nd Street |
| City: | New York |
| State/Country: | NEW YORK |
| Postal Code: | 10017 |

PROPERTY NUMBERS Total: 1

OP $40.00 12332944

| Property Type | Number |
|---|---|
| Application Number: | 12332944 |

CORRESPONDENCE DATA


Fax Number: (202)420-2201

*Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.*

Phone: 202-420-2200

Email: amosl@dsmo.com

Correspondent Name: Dickstein Shapiro LLP

Address Line 1: 1825 Eye Street, NW

Address Line 4: Washington, DISTRICT OF COLUMBIA 20006


| | |
|---|---|
| ATTORNEY DOCKET NUMBER: | M3248.0003/P003 |
| NAME OF SUBMITTER: | Lisa J. Amos |

Total Attachments: 22

source=m3248003assign#page1.tif
source=m3248003assign#page2.tif
source=m3248003assign#page3.tif
source=m3248003assign#page4.tif
source=m3248003assign#page5.tif
source=m3248003assign#page6.tif
source=m3248003assign#page7.tif
source=m3248003assign#page8.tif
source=m3248003assign#page9.tif
source=m3248003assign#page10.tif
source=m3248003assign#page11.tif
source=m3248003assign#page12.tif
source=m3248003assign#page13.tif
source=m3248003assign#page14.tif
source=m3248003assign#page15.tif
source=m3248003assign#page16.tif
source=m3248003assign#page17.tif
source=m3248003assign#page18.tif
source=m3248003assign#page19.tif
source=m3248003assign#page20.tif
source=m3248003assign#page21.tif
source=m3248003assign#page22.tif

ASSIGNMENT BY INVENTORS

**THIS ASSIGNMENT**, made by Peter Brams, Brigitte Devaux, Yi Wu, Kristopher Toy, Heidi N. LeBlanc, and Haichun Huang, all with a post office address of 521 Cottonwood Drive, Milpitas, California 95035 (hereinafter referred to as Assignors);

**WHEREAS**, Assignors have invented certain new and useful improvements in BINDING MOLECULES TO THE HUMAN OX40 RECEPTOR, set forth in a Provisional Patent Application of the United States, already filed on December 14, 2007, as U.S. Application No. 61/013,947, a Patent Application for Letters Patent of the United States, already filed on December 11, 2008, as U.S. Application No. 12/332,944, and an International Patent Application, already filed on December 11, 2008, as PCT/US2008/086417 and Honduran Patent Appln. No. 2008/1264 (collectively referred to as "Applications"); and

**WHEREAS**, MEDAREX, INC., being a corporation, organized under and pursuant to the laws of New Jersey, and having their principal place of business at 707 State Road, Princeton, New Jersey 08540 (hereinafter referred to as Assignee), is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to said inventions and said Applications, and in and to any Letters Patent of the United States and all foreign countries to be obtained therefore and thereon.

**NOW, THEREFORE**, in consideration of One Dollar ($1.00) and other good and sufficient consideration, the receipt of which is hereby acknowledged, Assignors have sold, assigned, transferred and set over, and by these presents do sell, assign, transfer and set over, unto Assignee, their successors, legal representatives and assigns, the entire right, title and interest in and to the above-mentioned inventions and Applications for Letters Patent, and in and to any and all direct and indirect divisions, continuations and continuations-in-part of said Applications, and any and all Letters Patent in the United States and all foreign countries which may be granted therefore and thereon, and reissues, reexaminations and extensions of said Letters Patent, and all rights under the International Convention for the Protection of Industrial Property including all rights of priority, the same to be held and enjoyed by Assignee, for their own use and benefit and the use and benefit of their successors, legal representatives and assigns, to the full end of the term

or terms for which Letters Patent may be granted and/or extended, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by Assignors, had this sale and assignment not been made.

**AND** for the same consideration, Assignors hereby represent and warrant to Assignee, their successors, legal representatives and assigns, that, at the time of execution and delivery of these presents, except for any rights, titles and/or interests that have arisen to Assignee under law or that have already been transferred to Assignee, Assignors are the lawful owners of the entire right, title and interest in and to the said inventions and Applications for Letters Patent above-mentioned, and that the same are unencumbered and that Assignors have good and full right and lawful authority to sell and convey the same in the manner herein set forth.

**AND** for the same consideration, Assignors hereby covenant and agree to and with Assignee, their successors, legal representatives and assigns, that Assignors will sign all papers and documents, take all lawful oaths and do all acts necessary or required to be done for the procurement, maintenance, enforcement and defense of any Letters Patent and applications for Letters Patent for said inventions, without charge to Assignee, their successors, legal representatives and assigns, whenever counsel of Assignee, or counsel of their successors, legal representatives and assigns, shall advise: that any proceeding in connection with said inventions, or said Applications for Letters Patent, or any proceeding in connection with any Letters Patent or Applications for Letters Patent for said inventions in any country, including but not limited to interference proceedings, is lawful and desirable; or, that any division, continuation or continuation-in-part of any application for Letters Patent, or any reissue, reexamination or extension of any Letters Patent, to be obtained thereon, is lawful and desirable.

**AND** Assignors hereby request the Commissioner of Patent and Trademarks to issue said Letters Patent of the United States to Assignee, as Assignee of said inventions and the Letters Patent to be issued thereon, for the use and benefit of Assignee, their successors, legal representatives and assigns.

**AND** Assignors hereby grant the following individuals the power to insert on this Assignment any further identification which may be necessary or desirable in order to comply with the rules of the United States Patent and Trademark Office for recordation of this document:

DICKSTEIN SHAPIRO LLP

All practitioners at Customer Number 24998

**AND** Assignors acknowledges an obligation of assignment of this invention to Assignee at the time the invention was made.

Date: 02-02-09

Peter Brams

**ACKNOWLEDGEMENT**

State of California ) s.s:
County of Santa Clara )

On February 2, 2009 before me, Nancy Lares Glynn, Notary Public
Date Insert Name and Title of the Officer

Personally appeared Peter Brams
Name(s) of Signer(s)

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

NANCY LARES GLYNN
Commission # 1654146
Notary Public - California
Santa Clara County
My Comm. Expires Mar 25, 2010

(Place Notary Seal Above)

Signature of Notary Public



DSMDB-2561385v01

Date: 02/04/2009

Brigitte Devaux

**ACKNOWLEDGEMENT**

State of California ) s.s:
)
County of Santa Clara ).

On February 4, 2009 before me, NANCY LARES GLYNN, Notary Public
Date Insert Name and Title of the Officer

Personally appeared Brigitte Devaux
Name(s) of Signer(s)

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

(Place Notary Seal Above)

Signature of Notary Public

NANCY LARES GLYNN
Commission # 1654146
Notary Public - California
Santa Clara County
My Comm. Expires Mar 25, 2010

Date: 2/12/09

Yi Wu

**ACKNOWLEDGEMENT**

State of California )
) s.s:
County of Santa Clara )

On 2/12/09 (Date) before me, Christopher R. Leach, Notary Public (Insert Name and Title of the Officer)

Personally appeared Yi Wu (Name(s) of Signer(s))

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

CHRISTOPHER R. LEACH
COMM. #1666772
NOTARY PUBLIC - CALIFORNIA
SAN MATEO COUNTY
COMM. EXPIRES MAY 14, 2010

(Place Notary Seal Above)

Signature of Notary Public

A3

Date: 1/30/09

Kristopher Toy

**ACKNOWLEDGEMENT**

State of California ) s.s:
)
County of SANTA CLARA )

On 1-30-09 (Date) before me, NANCY LARES GLYNN Notary Public (Insert Name and Title of the Officer)

Personally appeared Kristopher Toy
(Name(s) of Signer(s))

NANCY LARES GLYNN Commission # 1654146 Notary Public - California Santa Clara County My Comm. Expires Mar 25, 2010

(Place Notary Seal Above)

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

Signature of Notary Public







290

Date: Feb 4/09

Heidi LeBlanc

**ACKNOWLEDGEMENT**

State of California ) s.s:
)
County of Santa Clara )

On 2/4/09 (Date) before me, Christopher R. Leach, Notary Public (Insert Name and Title of the Officer)

Personally appeared Heidi LeBlanc (Name(s) of Signer(s))

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

CHRISTOPHER R. LEACH
COMM. #1666772
NOTARY PUBLIC - CALIFORNIA
SAN MATEO COUNTY
COMM. EXPIRES MAY 14, 2010

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

(Place Notary Seal Above)

Signature of Notary Public



DSMDB-2561385v01

Date: 2/4/09

Haichun Huang

**ACKNOWLEDGEMENT**

State of California ) s.s:
)
County of SANTA CLARA )

On FEBRUARY 4, 2009 before me, NANCY LARES GLYNN, Notary Public
Date Insert Name and Title of the Officer

Personally appeared Haichun Huang
Name(s) of Signer(s)

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

NANCY LARES GLYNN Commission # 1654146 Notary Public - California Santa Clara County My Comm. Expires Mar 25, 2010

(Place Notary Seal Above)

Signature of Notary Public



DSMDB-2561385v01

Date: 4 Feb 2009

Diana Hamlet-Cox
Vice President and Chief Patent Counsel
Direct Dial: 408-545-2723
Medarex, Inc.
521 Cottonwood Drive
Milpitas, CA 95035
Incorporation: State of New Jersey

**ACKNOWLEDGEMENT**

State of California ) s.s:
County of Santa Clara )

On February 4, 2009 (Date) before me, NANCY LARES GLYNN, Notary Public (Insert Name and Title of the Officer)

Personally appeared _____ (Name(s) of Signer(s))

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

NANCY LARES GLYNN Commission # 1654146 Notary Public - California Santa Clara County My Comm. Expires Mar 25, 2010

(Place Notary Seal Above)

Signature of Notary Public



DSMDB-2561385v01

LIAO

# ASSIGNMENT BY INVENTORS

**THIS ASSIGNMENT**, made by Jing Min; Yanli Wu; Rory F. Finn; Barrett R. Thiele; Wei Liao; Ronald F. Gladue; Arvind Rajpal; and Timothy J. Paradis (hereinafter referred to as Assignors), residing at 15309 Hooning Tree Court, Chesterfield, Missouri 63017; 1352 Kiefer Bluffs Drive, Ballwin, Missouri 63021; 976 Sunburst Court, Manchester, Missouri 63021; 5619 Dantonaire Place, Saint Louis, Missouri 63128; 17143 Hillcrest Meadow Drive, Chesterfield, Missouri 63005; 83 Powley Drive, Stonington, Connecticut 06378; 519 Foerster Street, San Francisco, California 94127; and 5 Beaver River Road, Richmond, Rhode Island 02892, respectively;

**WHEREAS**, Assignors have invented certain new and useful improvements in BINDING MOLECULES TO THE HUMAN OX40 RECEPTOR, set forth in a Provisional Patent Application of the United States, already filed on December 14, 2007, as U.S. Application No. 61/013,947, a Patent Application for Letters Patent of the United States, already filed on December 11, 2008, as U.S. Application No. 12/332,944, and an International Patent Application, already filed on December 11, 2008, as PCT/US2008/086417 and Honduran Patent Appln. No. 2008/1864 (collectively referred to as "Applications"); and

**WHEREAS**, Pfizer Inc., a corporation organized under and pursuant to the laws of Delaware having its principal place of business at 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 (hereinafter referred to as Assignee), is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to said inventions and said Applications, and in and to any Letters Patent of the United States and all foreign countries to be obtained therefore and thereon.

**NOW, THEREFORE**, in consideration of One Dollar ($1.00) and other good and sufficient consideration, the receipt of which is hereby acknowledged, Assignors have sold, assigned, transferred and set over, and by these presents do sell, assign, transfer and set over, unto Assignee, its successors, legal representatives and assigns, the entire right, title and interest in and to the above-mentioned inventions and Applications for Letters Patent, and in and to any and all direct and indirect divisions, continuations and continuations-in-part of said Applications, and any and all Letters Patent in the United States and all foreign countries which may be granted therefore and thereon, and reissues, reexaminations and extensions of said

Letters Patent, and all rights under the International Convention for the Protection of Industrial Property including all rights of priority, the same to be held and enjoyed by Assignee, for its own use and benefit and the use and benefit of its successors, legal representatives and assigns, to the full end of the term or terms for which Letters Patent may be granted and/or extended, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by Assignors, had this sale and assignment not been made.

**AND** for the same consideration, Assignors hereby represent and warrant to Assignee, its successors, legal representatives and assigns, that, at the time of execution and delivery of these presents, except for any rights, titles and/or interests that have arisen to Assignee under law or that have already been transferred to Assignee, Assignors are the lawful owners of the entire right, title and interest in and to the said inventions and Applications for Letters Patent above-mentioned, and that the same are unencumbered and that Assignors have good and full right and lawful authority to sell and convey the same in the manner herein set forth.

**AND** for the same consideration, Assignors hereby covenant and agree to and with Assignee, its successors, legal representatives and assigns, that Assignors will sign all papers and documents, take all lawful oaths and do all acts necessary or required to be done for the procurement, maintenance, enforcement and defense of any Letters Patent and applications for Letters Patent for said inventions, without charge to Assignee, its successors, legal representatives and assigns, whenever counsel of Assignee, or counsel of its successors, legal representatives and assigns, shall advise: that any proceeding in connection with said inventions, or said Applications for Letters Patent, or any proceeding in connection with any Letters Patent or Applications for Letters Patent for said inventions in any country, including but not limited to interference proceedings, is lawful and desirable; or, that any division, continuation or continuation-in-part of any application for Letters Patent, or any reissue, reexamination or extension of any Letters Patent, to be obtained thereon, is lawful and desirable.

**AND** Assignors hereby request the Commissioner of Patent and Trademarks to issue said Letters Patent of the United States to Assignee, as Assignee of said inventions and the Letters Patent to be issued thereon, for the use and benefit of Assignee, its successors, legal representatives and assigns.

**AND** Assignors hereby grant the following individuals the power to insert on this Assignment any further identification which may be necessary or desirable in order to comply with the rules of the United States Patent and Trademark Office for recordation of this document:

DICKSTEIN SHAPIRO LLP

All practitioners at Customer Number 24998

**AND** Assignors acknowledge an obligation of assignment of this invention to Assignee at the time the invention was made.

Jing Min

Date: December 23, 2005

United States of America )
State of Missouri ) ss.:
County of St. Louis )

On this 23rd day of December, 2005, before me personally came Jing Min, to me known to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution of the same.

Notary Public

JEAN L. KELEMEN
Notary Public-Notary Seal
STATE OF MISSOURI
Commissioned for St. Charles County
My Commission Expires: 06/02/2012
Commission # 08381213

Yanli Wu

Date: January 5, 2009

United States of America )
State of Missouri ) ss.:
County of St. Louis )

On this 5th day of January, 2009, before me personally came Yanli Wu, to me known to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution of the same.

Notary Public

JEAN L. KELEMEN
Notary Public-Notary Seal
STATE OF MISSOURI
Commissioned for St. Charles County
My Commission Expires: 06/02/2012
Commission # 08381218

52

Rory F. Finn

Date: January 5, 2009

United States of America )
State of Missouri ) ss.:
County of St. Louis )

On this 5th day of January, 2009, before me personally came Rory F. Finn, to me known to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution of the same.

Notary Public

JEAN L. KELEMEN
Notary Public-Notary Seal
STATE OF MISSOURI
Commissioned for St. Charles County
My Commission Expires: 06/02/2012
Commission # 08381218

53

Barrett R. Thiele

Date: January 5, 2009

United States of America )
State of Missouri ) ss.:
County of St. Louis )

On this 5th day of January, 2009, before me personally came Barrett R. Thiele, to me known to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution of the same.

Notary Public

JEAN L. KELEMEN
Notary Public-Notary Seal
STATE OF MISSOURI
Commissioned for St. Charles County
My Commission Expires: 06/02/2012
Commission # 06381218



300

5A

Wei Laio

LIAO

Date: 1/5/2009

United States of America )
State of MO ) ss.:
County of St Louis )

On this 5th day of January, 2009, before me personally came Wei Laio, to me known to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution of the same.

LIAO

Notary Public

Krayle Lutke
Notary Public Notary Seal
State of Missouri County of St. Louis
My Commission Expires 11/15/2012
Commission # 08633354

55

Ronald P. Gladue

Date: 06 JANUARY 2009

United States of America )
State of CONNECTICUT ) ss.: GROTON
County of NEW LONDON )

On this 6TH day of JANUARY, 2009, before me personally came Ronald P. Gladue, to me known to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution of the same.

Notary Public

STEPHANIE A. BRODEUR
NOTARY PUBLIC
MY COMMISSION EXPIRES
31 DECEMBER 2009

56

Date: 1/5/09

Arvind Rajpal

**ACKNOWLEDGEMENT**

State of California ) s.s:
)
County of San Mateo )

On 01-05-09 (Date) before me, Brigitte Olighef, Notary Public (Insert Name and Title of the Officer)

Personally appeared Arvind Rajpal
Name(s) of Signer(s)

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person~~(s)~~ whose name~~(s)~~ is/~~are~~ subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/~~she/they~~ executed the same in his/~~her/their~~ authorized capacity~~(ies)~~, and that by his/~~her/their~~ signature~~(s)~~ on the instrument the person~~(s)~~, or the entity upon behalf of which the person~~(s)~~ acted, executed the instrument the person~~(s)~~, or the entity upon behalf of which the person~~(s)~~ acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

BRIGITTE OLIGHEF
COMM. # 1690358
NOTARY PUBLIC-CALIFORNIA
SAN MATEO COUNTY
My Comm. Exp. Aug. 26, 2010

(Place Notary Seal Above)

Signature of Notary Public

Timothy J. Paradis

Date: 06 JANUARY 2009

United States of America )
State of CONNECTICUT ) ss.: GROTON
County of NEW LONDON )

On this 6TH day of JANUARY, 2009, before me personally came Timothy J. Paradis, to me known to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution of the same.

Notary Public

STEPHANIE A. BRODEUR
NOTARY PUBLIC
MY COMMISSION EXPIRES
31 DECEMBER 2009

Date: JAN 2 1 2009

Pfizer Inc.

Name: Peter C. Richardson

Title: Assistant Secretary

Annette D Cromer
Notary Public, State of New York
No. 01CR6194598
Certificate Filed in New York County
Commission Expires October 6, 2012

State of New York)
County of New York)

SUBSCRIBED and SWORN to me before me this 21st day of January 2009

Traducción oficial de un documento que está originalmente en inglés.

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

A TODOS QUIENES VIEREN EL PRESENTE DOCUMENTO:

Departamento de Comercio de los Estados Unidos

Oficina de Patentes y Marcas Registradas de los Estados Unidos

28 de junio de 2010

Se certifica que la copia anexa es una copia verdadera de los registros de esta oficina de un documento radicado el día 6 de abril de 2010.

Por autoridad del Subsecretario de Comercio para la Propiedad Intelectual y Director de la Oficina de Patentes y Marcas Registradas de los Estados Unidos.

(Firmado) P. Swain - Funcionario que certifica.

Sello: "Departamento de Comercio, Oficina de Patentes y Marcas Registradas de los Estados Unidos"

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

CESIÓN DE PATENTE

Versión Electrónica v1.1
Versión de hoja de estilo v1.1

| | |
|---|---|
| Tipo de envío: | Nueva Cesión |
| Naturaleza de la transferencia: | Cesión |

Datos de las partes que realizan la transferencia

| Nombre | Fecha de ejecución |
|---|---|
| Medarex Inc. | 31 de marzo de 2010 |

Datos de las partes que reciben

| | |
|---|---|
| Nombre: | Bristol-Myers Squibb Company |
| Dirección: | Route 206 & Province Line Rd. |
| Ciudad: | Princeton |
| Estado/País: | New Jersey |
| Código postal: | 08540 |

Número total de propiedades: 13

| Tipo de propiedad | Número |
|---|---|
| Número de la solicitud: | 60876109 |
| Número de la solicitud: | 12518856 |
| Número de la solicitud: | 61013947 |
| Número de la solicitud: | 12332944 |
| Número de la solicitud: | 61073430 |
| Número de la solicitud: | 12480991 |
| Número de la solicitud: | 61095429 |
| Número de la solicitud: | 61026207 |
| Número de la solicitud: | 12365638 |
| Número PCT: | US0725975 |
| Número PCT: | US0886417 |
| Número PCT: | US0946837 |
| Número PCT: | US0933042 |

Datos para la correspondencia:

Número de Fax: (202) 420-2201

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Miniusticia

*La correspondencia será enviada por US Mail cuando el intento de hacerlo por fax no sea exitoso.*

| | |
|---|---|
| Teléfono: | 202-420-2200 |
| E-mail: | parsonse@dicksteinshapiro.com |
| Nombre del correspondiente: | Dickstein Shapiro LLP |
| Dirección línea 1: | 1825 Eye Street, NW* |
| Dirección línea 4: | Washington, DISTPICT OF COLUMBIA 20006 |

| | |
|---|---|
| Número del registro del Representante: | M3248.0001 |
| Nombre del remitente: | Elizabeth Parsons |
| Total de anexos: 9<br>Fuente=BMS#page1.tif<br>Fuente=BMS#page2.tif<br>Fuente=BMS#page3.tif<br>Fuente=BMS#page4.tif<br>Fuente=BMS#page5.tif<br>Fuente=BMS#page6.tif<br>Fuente=BMS#page7.tif<br>Fuente=BMS#page8.tif<br>Fuente=BMS#page9.tif | |

# CESIÓN DE PATENTE

ESTA CESIÓN es hecha para que entre en vigencia el 31 de marzo de 2010 (la "Fecha de Entrada en Vigencia") por Medarex, Inc., una compañía de New Jersey (denominada de ahora en adelante "Cedente"), y Bristol-Myers Squibb Company, una compañía de Delaware (denominada de ahora en adelante "Cesionario"), certifica:

PUESTO QUE dicho Cedente es copropietario, junto con Pfizer Inc., de ciertos inventos descritos en las patentes y solicitudes de patente que se presentan en la Tabla que se incluye en este documento, junto con cualquier patente que se expida sobre las mismas, solicitudes que reclamen prioridad para las mismas, reexpediciones, continuaciones, continuaciones parciales, divisiones, reexámenes,

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 • 1993 Minjusticia

solicitudes de nivel nacional y solicitudes extranjeras relacionadas de las mismas (denominadas colectivamente "Patentes");

PUESTO QUE el Cedente es un subsidiario propietario en totalidad del Cesionario; y,

PUESTO QUE el Cedente desea ceder y el Cesionario desea adquirir el derecho, título e interés del Cedente en dichas Patentes,

ENTONCES, POR LO TANTO, por buena y valiosa consideración, recibo y suficiencia de lo cual se está reconociendo por el presente, el Cedente vende, cede, transfiere y traspasa al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios la totalidad del derecho, título e interés del Cedente sobre dichas Patentes y todos los derechos que el Cedente ha disfrutado de acuerdo con ellas tanto en los Estados Unidos de América como en el resto de países del mundo, incluyendo la totalidad de los derechos de recuperación con base en la infracción pasada y futura de dichas Patentes

*(Sigue la página de firmas)*

CEDENTE

Medarex Inc.

Por: (Firmado) Nombre: Paul Golian

Cargo: Abogado General Asistente

Traductor Oficial 310
JORGE E. SIERRA REYES
Decreto 376 - 1993 Minjusticia

RECONOCIMIENTO PARA TODOS LOS PROPÓSITOS CALIFORNIA

Estado de California

Condado de Santa Clara

El día 31 de marzo de 2010, ante mí, Christopher R. Leach, Notario Público, se presentó personalmente Paul Golian, quien comprobó ante mí con evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre está suscrito al instrumento adjunto y reconoció ante mí que lo ejecutó como persona autorizada y que por su firma en dicho instrumento, la persona o la entidad en nombre de la cual actuó, ejecutó el instrumento.

Certifico, consciente de la pena por perjurio según las leyes del Estado de California, que el anterior párrafo es verdadero y correcto.

En constancia de lo anterior, firmo y estampo el sello oficial.

(Firmado) Notario Público

Sello: "Christopher R. Leach, Nombramiento #1666772. Notario Público de California, Condado de San Mateo. Mi nombramiento vence el 14 de mayo de 2010".

Descripción del documento adjunto:

Título o tipo de documento: Cesión

No. de páginas 7

Fecha: 31 de marzo de 2010.

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Decreto 376 - 1993 Minjusticia

Calidades de los signatarios

Nombre del signatario: Paul Golian

(X) Funcionario corporativo. Cargo: Abogado General Asistente

El signatario está representando a MEDAREX, INC.

(Huella del pulgar derecho del signatario)

---

RECONOCIMIENTO PARA TODOS LOS PROPÓSITOS CALIFORNIA

Estado de California

Condado de Santa Clara

El día 31 de marzo de 2010, ante mí, Christopher P. Leach, Notario Público, se presentó personalmente Paul Golian, quien comprobó ante mí con evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre está suscrito al instrumento adjunto y reconoció ante mí que lo ejecutó como persona autorizada y que por su firma en dicho instrumento, la persona o la entidad en nombre de la cual actuó, ejecutó el instrumento.

Certifico, consciente de la pena por perjurio según las leyes del Estado de California, que el anterior párrafo es verdadero y correcto.

En constancia de lo anterior, firmo y estampo el sello oficial.

(Firmado) Notario Público

Sello: "Christopher P. Leach, Nombramiento #1666772. Notario Público de California, Condado de San Mateo. Mi nombramiento vence el 14 de mayo de 2010".

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

65

Descripción del documento adjunto:

Título o tipo de documento: Cesión

No. de páginas 7

Fecha: 31 de marzo de 2010.

Calidades de los signatarios

Nombre del signatario: Paul Golian

(X) Funcionario corporativo. Cargo: Abogado General Asistente

El signatario está representando a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY.

(Huella del pulgar derecho del signatario)

TABLA

| Título | Solicitud No. | Fecha de radicación | País |
|---|---|---|---|
| Anticuerpos CD14 | 60/876,109 | 12/21/2006 | EE.UU |
| Anticuerpos CD14 | 12/518,856 | 12/20/2007 | EE.UU |
| Anticuerpos CD14 | PCT/US07/25975 | 12/20/2007 | PCT |
| Anticuerpos y métodos del receptor ox40 | 61/013,947 | 12/14/2007 | EE.UU |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | 12/332,944 | 12/11/2008 | EE.UU |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | PCT/US0886417 | 12/11/2008 | PCT |
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | 61/073,430 | 6/18/2008 | EE.UU |
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | 12/480,991 | 6/9/2009 | EE.UU |
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | PCT/US09/46837 | 6/10/2009 | PCT |

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

| | | | |
|---|---|---|---|
| Anticuerpos Alfa5–Beta 1 y sus usos | 61/095,429 | 9/9/2008 | EE.UU |
| Anticuerpos Alfa5–Beta 1 y sus usos | 61/026,207 | 12/5/2008 | EE.UU |
| Anticuerpos Alfa5–Beta 1 y sus usos | 12/365,638 | 2/4/2009 | EE.UU |
| Anticuerpos Alfa5–Beta 1 y sus usos | PCT/US09/33042 | 2/4/2009 | PCT |

TABLA (continuación)

| Título | Solicitud No./Patente No. | Fecha de radicación/ expedición | País |
|---|---|---|---|
| Anticuerpos CD44 | 2,672,916 | 12/20/2007 | Canadá |
| Anticuerpos CD44 | 07863135.5 | 12/20/2007 | EPC |
| Anticuerpos CD44 | 2007338844 | 12/20/2007 | Australia |
| Anticuerpos CD44 | PI0720477-9 | 12/20/2007 | Brasil |
| Anticuerpos CD44 | 199384 | 12/20/2007 | Israel |
| Anticuerpos CD44 | 4256/DELNP/2009 | 12/20/2007 | India |
| Anticuerpos CD44 | MX/a/2009/006891 | 12/20/2007 | México |
| Anticuerpos CD44 | 10-2009-7015180 | 12/20/2007 | Corea Sur |
| Anticuerpos CD44 | 2009128064 | 12/20/2007 | Rusia |
| Anticuerpos CD44 | 2009-542902 | 12/20/2007 | Japón |
| Anticuerpos CD44 | 200780050041.X | 12/20/2007 | China |
| Anticuerpos CD44 | 101016589 | 12/20/2007 | Hong Kong |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | 097148544 | 12/12/2008 | Taiwán |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | P080105418 | 12/9/2008 | Argentina |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | OCT-01/081211.01 | 12/10/2008 | Aruba |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | 2123 | 12/12/2008 | Bahamas |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | SP-280379 | 12/14/2008 | Bolivia |

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

| | | | |
|---|---|---|---|
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | 3706-08 | 12/12/2008 | Chile |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | 12407 | 12/14/2008 | Consejo de cooperación del Golfo |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | 2008/1864 | 12/12/2008 | Honduras |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | 8649 | 12/15/2008 | Líbano |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | NG/C/2008/679<br>NG/C/2008/679 | 12/12/2008<br>12/12/2008 | Nigeria |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | 1450/2008 | 12/13/2008 | Pakistán |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | 88076 | 12/12/2008 | Panamá |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | 2008/47181 | 12/12/2008 | Paraguay |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | 2051/2008 | 12/11/2008 | Perú |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | 0801006374 | 12/12/2008 | Tailandia |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | 31,533 | 12/15/2008 | Uruguay |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | 02589-2008 | 12/12/2008 | Venezuela |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | N/A | 12/14/2008 | Kosovo |
| Unión de moléculas al receptor humano OX40 | 325/2008 | 12/14/2008 | Bangladesh |
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | 539,2009 | 06/17/2009 | Pakistán |
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | 31.904 | 06/16/2009 | Uruguay |
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | P090102194 | 06/17/2009 | Argentina |
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | 0901002750 | 06/18/2009 | Tailandia |
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | OCT-01/090616 | 06/16/2009 | Aruba |
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | SP-172-09 | 06/15/2009 | Bolivia |
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | N/A | 06/17/2009 | Bahamas |

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

| | | | |
|---|---|---|---|
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | 13728 | 06/17/2009 | Consejo de cooperación del Golfo |
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | 2009/1199 | 06/18/2009 | Honduras |
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | 394 | 06/18/2009 | Kosovo |
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | 8654 | 06/18/2009 | Líbano |
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | NG/C/2009/343 | 06/15/2009 | Nigeria |
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | 88307 | 06/17/2009 | Panamá |
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | 20346/2009 | 06/17/2009 | Paraguay |
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | 098120543 | 06/18/2009 | Taiwán |
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | 001106-09 | 06/18/2009 | Venezuela |
| Anticuerpos para IL-6 y sus usos | 151/2009 | 06/17/2009 | Bangladesh |

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

69

*Apostilla adjunta:*

APOSTILLA:

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

| | |
|---|---|
| 1. País: | Estados Unidos de América |
| | El presente documento público |
| 2. Ha sido firmado por: | P. Swain |
| 3. Actuando en calidad de: | Funcionario de Certificación |
| 4. Lleva el sello/estampilla de: | Patentes y Marcas Registradas de Estados Unidos |
| | Certificado |
| 5. En: | Washington D.C. |
| 6. El: | Día nueve de agosto de 2010 |
| 7. Por: | Funcionario Asistente de Autenticación<br>Departamento de Estado, Estados Unidos |
| 8. Bajo el No.: | 10037872-4 |
| 9. Sello / estampilla: | = |
| 10. Firma: | (Firmado)<br>Fernesia T. Crawford |

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
OFICINA DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.
2010 SET 17 P 2:03

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO PRESENTADO
LA FIRMA ANTERIOR ES AUTENTICA
NO SE ASUME RESPONSABILIDAD POR EL CONTENIDO DEL TEXTO

*FIN DE LA TRADUCCIÓN*

Certificación:
Certifico que la presente es una traducción auténtica y completa del inglés al español del documento adjunto, la cual he elaborado según mi leal saber y entender.
Documento: "Medarex Inc. –Cesión de Patente"
Fecha: 25 de agosto 2010.
Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes (Sello y firma digital debidamente registrados ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia)
Licencia # 376 de 1993, expedida por el Ministerio de Justicia.
Dirección: Carrera 15 # 99-13 Of. 411, Bogotá, D.C.
Teléfonos: (571) 218 2308, (571) 623 2925.
E-mail: traveser1@yahoo.com
Traducción # 15-396

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

# APOSTILLE

*(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)*

1. Country: *United States of America*

This public document

2. has been signed by P. Swain

3. acting in the capacity of Certify Officer

4. bears the seal/stamp of U. S. Patent and Trademark Office

**Certified**

5. at Washington, D.C.

6. the ninth of August, 2010

7. by *Assistant Authentication Officer, United States Department of State*

8. No. 10037872-4

9. Seal/Stamp

10. Signature:

Fernesia T. Crawford

A 7246359

# THE UNITED STATES OF AMERICA

## TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

**UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE**
**United States Patent and Trademark Office**

**June 28, 2010**

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON APRIL 06, 2010.**

**By Authority of the**
**Under Secretary of Commerce for Intellectual Property**
**and Director of the United States Patent and Trademark Office**

**P. SWAIN**
**Certifying Officer**

# PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

| | |
|---|---|
| SUBMISSION TYPE: | NEW ASSIGNMENT |
| NATURE OF CONVEYANCE: | ASSIGNMENT |

CONVEYING PARTY DATA

| Name | Execution Date |
|---|---|
| Medarex, Inc. | 03/31/2010 |

RECEIVING PARTY DATA

| | |
|---|---|
| Name: | Bristol-Myers Squibb Company |
| Street Address: | Route 206 & Province Line Rd. |
| City: | Princeton |
| State/Country: | NEW JERSEY |
| Postal Code: | 08540 |

PROPERTY NUMBERS Total: 13

| Property Type | Number |
|---|---|
| Application Number: | 60876109 |
| Application Number: | 12518856 |
| Application Number: | 61013947 |
| Application Number: | 12332944 |
| Application Number: | 61073430 |
| Application Number: | 12480991 |
| Application Number: | 61095429 |
| Application Number: | 61026207 |
| Application Number: | 12365638 |
| PCT Number: | US0725975 |
| PCT Number: | US0836417 |
| PCT Number: | US0946837 |
| PCT Number: | US0933042 |

OP $520.00 60876109

CORRESPONDENCE DATA



320

| | |
|---|---|
| Fax Number: | (202)420-2201 |
| *Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.* | |
| Phone: | 202-420-2200 |
| Email: | parsonse@dicksteinshapiro.com |
| Correspondent Name: | Dickstein Shapiro LLP |
| Address Line 1: | 1825 Eye Street NW |
| Address Line 4: | Washington, DISTRICT OF COLUMBIA 20006 |

| | |
|---|---|
| ATTORNEY DOCKET NUMBER: | M3245.0001 |
| NAME OF SUBMITTER: | Elizabeth Parsons |

Total Attachments: 9
source=BMS#page1.tif
source=BMS#page2.tif
source=BMS#page3.tif
source=BMS#page4.tif
source=BMS#page5.tif
source=BMS#page6.tif
source=BMS#page7.tif
source=BMS#page8.tif
source=BMS#page9.tif

**PATENT ASSIGNMENT**

THIS ASSIGNMENT, made to be effective as of March 31, 2010 (the "Effective Date") by Medarex, Inc., a New Jersey corporation (hereinafter referred to as the "Assignor"), and Bristol-Myers Squibb Company, a Delaware corporation (hereinafter referred to as the "Assignee"), witnesseth:

WHEREAS, the said Assignor is a joint owner, together with Pfizer Inc., of certain inventions described in the patents and patent applications set forth on the Schedule hereto, together with any patents issuing thereon, applications claiming priority thereto, reissues, continuations, continuations-in-part, divisionals, reexaminations, national stage applications and foreign related applications thereof (collectively referred to as "Patents");

WHEREAS, Assignor is a wholly owned subsidiary of Assignee; and

WHEREAS, Assignor desires to assign, and Assignee desires to acquire, Assignor's right, title and interest in said Patents.

NOW, THEREFORE, for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which are hereby acknowledged, the Assignor does hereby sell, assign, transfer and set over, unto the Assignee, its successors, legal representatives and assigns, all of Assignor's right, title and interest in and to said Patents and all rights which the Assignor has enjoyed thereunder both in the United States of America and throughout all countries of the world, including any and all rights of recovery based on past and future infringement of said Patents.

[*signature page follows*]

ASSIGNOR:

Medarex, Inc.

By: _____
Name: Paul Golian
Title: Assistant General Counsel

STATE OF _____ )
) ss:
COUNTY OF _____ )

On this ____ day of _____ 2010, personally before me came the above-named _____ who executed this Assignment in my presence and acknowledged to me that he did so of his own free will and in his authorized capacity for the purposes set forth herein.

(SEAL)

_____
Notary Public

See Attachment

ASSIGNEE:

Bristol-Myers Squibb Company

By: _____
Name: Paul Golian
Title: Assistant General Counsel

STATE OF _____ )
) ss:
COUNTY OF _____ )

On this ____ day of _____ 2010, personally before me came the above-named _____ who executed this Assignment in my presence and acknowledged to me that he did so of his own free will and in his authorized capacity for the purposes set forth herein.

(SEAL)

_____
Notary Public

See Attachment

## CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of Santa Clara

On 3/31/2010 (Date) before me, Christopher R Leach - Notary Public (Here Insert Name and Title of the Officer)

personally appeared Paul Golden (Name(s) of Signer(s))

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature Christopher R Leach (Signature of Notary Public)

CHRISTOPHER R. LEACH
COMM. # 1805772
NOTARY PUBLIC - CALIFORNIA
SAN MATEO COUNTY
COMM. EXPIRES MAY 14, 2010

Place Notary Seal Above

### OPTIONAL

*Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.*

**Description of Attached Document**

Title or Type of Document: Assignment

Document Date: 3/31/10 Number of Pages: 7

Signer(s) Other Than Named Above: _____

**Capacity(ies) Claimed by Signer(s)**

| Signer's Name: Paul Golden | Signer's Name: |
|---|---|
| ☐ Individual | ☐ Individual |
| ☒ Corporate Officer — Title(s): CFO, Secretary | ☐ Corporate Officer — Title(s): |
| ☐ Partner — ☐ Limited ☐ General | ☐ Partner — ☐ Limited ☐ General |
| ☐ Attorney in Fact | ☐ Attorney in Fact |
| ☐ Trustee | ☐ Trustee |
| ☐ Guardian or Conservator | ☐ Guardian or Conservator |
| ☐ Other: | ☐ Other: |
| Signer Is Representing: MacDermid, Inc. | Signer Is Representing: |
| RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER — Top of thumb here | RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER — Top of thumb here |

© 2007 National Notary Association • 9350 De Soto Ave., P.O. Box 2402 • Chatsworth, CA 91313-2402 • www.NationalNotary.org Item #5907 Reorder: Call Toll-Free 1-800-876-6827

## CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of Santa Clara }

On 3/31/10 (Date) before me, Christopher R Leach Notary Public (Here Insert Name and Title of the Officer)

personally appeared Paul Golian (Name(s) of Signer(s))

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/~~are~~ subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/~~she/they~~ executed the same in his/~~her/their~~ authorized capacity(~~ies~~), and that by his/~~her/their~~ signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature Christopher R Leach (Signature of Notary Public)

CHRISTOPHER P. LEACH
COMM. #1886772
NOTARY PUBLIC - CALIFORNIA
SAN MATEO COUNTY
COMM. EXPIRES MAY 14, 2010

Place Notary Seal Above

### OPTIONAL

*Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.*

**Description of Attached Document**

Title or Type of Document: Assignment

Document Date: 3/31/2010 Number of Pages: 7

Signer(s) Other Than Named Above: _____

**Capacity(ies) Claimed by Signer(s)**

Signer's Name: Paul Golian
☐ Individual
☒ Corporate Officer — Title(s): Asst. General Counsel
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney in Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____
Signer Is Representing: Applied Materials

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

Signer's Name: _____
☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney in Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____
Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

©2007 National Notary Association • 9350 De Soto Ave., P.O. Box 2402 • Chatsworth, CA 91313-2402 • www.NationalNotary.org Item #5907 Reorder Call Toll-Free 1-800-876-6827

## SCHEDULE

| Title | Application No. | Filing Date | Country |
|---|---|---|---|
| CD44 Antibodies | 60/876,109 | 12/21/2006 | U.S. |
| CD44 Antibodies | 12/518,856 | 12/20/2007 | U.S. |
| CD44 Antibodies | PCT/US07/25975 | 12/20/2007 | PCT |
| OX40 Receptor Antibodies and Methods | 61/013,947 | 12/14/2007 | U.S. |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | 12/332,944 | 12/11/2008 | U.S. |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | PCT/US08/86417 | 12/11/2008 | PCT |
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | 61/073,430 | 6/18/2008 | U.S. |
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | 12/480,991 | 6/9/2009 | U.S. |
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | PCT/US09/46837 | 6/10/2009 | PCT |
| Alpha5-Beta1 Antibodies and Their Uses | 61/095,429 | 9/9/2008 | U.S. |
| Alpha5-Beta1 Antibodies and Their Uses | 61/026,207 | 2/5/2008 | U.S. |
| Alpha5-Beta1 Antibodies and Their Uses | 12/365,638 | 2/4/2009 | U.S. |
| Alpha5-Beta1 Antibodies and Their Uses | PCT/US09/33042 | 2/4/2009 | PCT |

**SCHEDULE (con't)**

| Title | Application No./ Patent No. | Filing Date/ Issue Date | Country |
|---|---|---|---|
| CD44 Antibodies | 2,672,916 | 12/20/2007 | Canada |
| CD44 Antibodies | 07863135.5 | 12/20/2007 | EPC |
| CD44 Antibodies | 2007338844 | 12/20/2007 | Australia |
| CD44 Antibodies | PI0720477-9 | 12/20/2007 | Brazil |
| CD44 Antibodies | 199384 | 12/20/2007 | Israel |
| CD44 Antibodies | 4256/DELNP/2009 | 12/20/2007 | India |
| CD44 Antibodies | MX/a/2009/006891 | 12/20/2007 | Mexico |
| CD44 Antibodies | 10-2009-7015180 | 12/20/2007 | South Korea |
| CD44 Antibodies | 2009128064 | 12/20/2007 | Russia |
| CD44 Antibodies | 2009-542902 | 12/20/2007 | Japan |
| CD44 Antibodies | 200780050041.X | 12/20/2007 | China |
| CD44 Antibodies | 101016589 | 12/20/2007 | Hong Kong |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | 097148544 | 12/12/2008 | Taiwan |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | P080105418 | 12/9/2008 | Argentina |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | OCT-01/081211.01 | 12/10/2008 | Aruba |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | 2123 | 12/12/2008 | Bahamas |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | SP-280379 | 12/14/2008 | Bolivia |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | 3706-08 | 12/12/2008 | Chile |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | 12407 | 12/14/2008 | Gulf Cooperation Council |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | 2008/1564 | 12/12/2008 | Honduras |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | 8649 | 12/15/2008 | Lebanon |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | NG/C/2008/679<br>NG/C/2008/679 | 12/12/2008<br>12/12/2008 | Nigeria |

| Title | Application No./ Patent No. | Filing Date/ Issue Date | Country |
|---|---|---|---|
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | 1450/2008 | 12/13/2008 | Pakistan |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | 88076 | 12/12/2008 | Panama |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | 2008/47181 | 12/12/2008 | Paraguay |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | 2051/2008 | 12/11/2008 | Peru |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | 0801006374 | 12/12/2008 | Thailand |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | 31.533 | 12/15/2008 | Uruguay |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | 02589-2008 | 12/12/2008 | Venezuela |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | N/A | 12/14/2008 | Kosovo |
| Binding Molecules to the Human OX40 Receptor | 325/2008 | 12/14/2008 | Bangladesh |
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | 539/2009 | 06/17/2009 | Pakistan |
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | 31.904 | 06/16/2009 | Uruguay |
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | P090102194 | 06/17/2009 | Argentina |
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | 0901002750 | 06/18/2009 | Thailand |
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | OCT-01/090616 | 06/16/2009 | Aruba |
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | SP-172-09 | 06/15/2009 | Bolivia |
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | N/A | 06/17/2009 | Bahamas |
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | 13728 | 06/17/2009 | Gulf Cooperation Council |
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | 2009/1199 | 06/18/2009 | Honduras |
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | 394 | 06/18/2009 | Kosovo |

| Title | Application No./ Patent No. | Filing Date/ Issue Date | Country |
|---|---|---|---|
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | 8654 | 06/18/2009 | Lebanon |
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | NG/C/2009/343 | 06/15/2009 | Nigeria |
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | 88307 | 06/17/2009 | Panama |
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | 20346/2009 | 06/17/2009 | Paraguay |
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | 098120543 | 06/18/2009 | Taiwan |
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | 001106-09 | 06/18/2009 | Venezuela |
| Antibodies to IL-6 and Their Uses | 151/2009 | 06/17/2009 | Bangladesh |