



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-044004- -00000-0000

Fecha: 2013-03-05 15:09:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: ANTICUERPOS ANTI-OX40 Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL C07K 16/28

71. SOLICITANTE: BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

DOMICILIO: Texas, Estados Unidos de América.

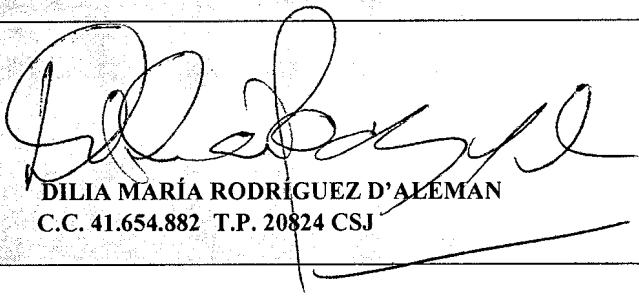
74. APODERADO DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C.

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO No. 13-044004- -00000-0000 Fecha: 2013-03-05 15:09:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 189
---	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2011/048752	Fecha 23 de Agosto de 2011
Publicación Internacional No.		WO 2012/027328 A2	Fecha 01 de Marzo de 2012
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
ANTICUERPOS ANTI-OX40 Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) C07K 16/28		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN: 201 West 7th Street Austin,		No. TELÉFONO:	
CIUDAD: Texas 78701,		LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Estados Unidos de América	
PAÍS DE RESIDENCIA: Estados Unidos de América			
7	INVENTOR (ES)		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1.LIU,		Yong-Jun	Estadounidense
2.VOO,		Kui Shin	Malayo
3.BOVER,		Laura	Argentina
4.TSURUSHITA,		Naoya	Japonés
5.TSO, J.,		Yun	Estadounidense
6.KUMAR,		Shankar	Estadounidense
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
DIRECCIÓN		CIUDAD	ESTADO
1. 2623 West Bainbridge Circle,		Pearland,	Texas 77584,
2. 2207 Drake Falls,		Pearland,	Texas 77584,
3. 4522 Brookren Court		Pearland,	Texas 77584,
4. 3719 Redwood Circle		Palo Alto,	California 94306
5. 445 Oak Grove Avenue #16		Menlo Park,	California 94025
6. 3930 Kral Place		Pleasanton,	California 94588
			PAÍS RESIDENCIA
			Estados Unidos de América
			Estados Unidos de América
			Estados Unidos de América
			Estados Unidos de América
			Estados Unidos de América
			Estados Unidos de América
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
RODRIGUEZ D’ALEMAN		DILIA MARIA	C.C.41.654.882 T.P.20824 CSJ
DIRECCIÓN Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6		No. TELÉFONO 6181088	
CIUDAD Bogotá, D.C.		CORREO ELECTRÓNICO clarkemodet@clarkemodet.com.co	
PAÍS Colombia			
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
1.Estados Unidos de América		US	61/375.999
2.Estados Unidos de América		US	61/380.827
			(32) FECHA AAA/MM/DD
			2010/08/23
			2010/09/08

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 13-017708 // 13-021378	Fecha 21/02/2013 04/03/2013
16	FIRMA DEL APODERADO :		
 DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN C.C. 41.654.882 T.P. 20824 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 114		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 19		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 50		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	
		P-3682	

ANTICUERPOS ANTI-OX40 Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS**CAMPO DE LA INVENCION**

Esta invención se refiere generalmente a la
5 modulación de la activación del receptor OX40 y más
particularmente, a la modulación del receptor OX40 para
inhibir la función inmunosupresora de interleucina 10 (IL-10)
que produce células T reguladoras tipo 1 CD4⁺ ("células Tr1")
y células T reguladoras que expresan Foxp3⁺ (a veces también
10 referidas en la presente como células "T-reg Foxp3⁺") y la
generación de células Tr1 de células CD4⁺ o células naïve y
producción de IL-10.

REFERENCIA CRUZADA A LA SOLICITUD RELACIONADA

15 Esta solicitud reclama el beneficio y prioridad de
la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Serie No.
61/375,999 presentada el 23 de agosto de 2010 y la Solicitud
de Patente de los Estados Unidos Serie No. 61/380,827
presentada el 08 de septiembre de 2010. Ambas solicitudes se
20 incorporan en la presente por referencia.

DECLARACIÓN CON RESPECTO AL DESARROLLO O INVESTIGACIÓN**FEDERALMENTE PATROCINADA**

Esta invención se hizo con el apoyo del gobierno
25 bajo R01 AI061645-01, R01 AI062888-01 y U19 AI071130-01
otorgado por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno
tiene ciertos derechos en la invención.

000002

LOS NOMBRES DE LOS TERCEROS PARA UN ACUERDO DE
INVESTIGACIÓN CONJUNTA

Ninguno

5 REFERENCIA A LA LISTA DE SECUENCIAS

Esta descripción incluye un listado de secuencias
presentado como un archivo de texto de acuerdo con 37 C.F.R.
§ 1.52(e)(v) nombrado sequence listing.txt, creado el 23 de
agosto de 2011, con un tamaño de 13,836 bytes, el cual se
10 incorpora en la presente por referencia. Las descripciones de
secuencia y Listado de Secuencias adjuntos cumplen con las
reglas que rigen las descripciones de secuencia de
nucleótidos y/o aminoácidos en las solicitudes de patente
como se describe en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.825. El listado de
15 secuencias contiene el código de una letra para caracteres de
secuencia de nucleótidos y los códigos de tres letras para
aminoácidos como se define de conformidad con los estándares
de la IUPAC-IUBMB descritos en Nucleic Acids Res. 13:3021-
3030 (1985) y en Biochemical J. 219 (No. 2):345-373 (1984).
20 Los símbolos y el formato utilizados para los datos de
secuencia de nucleótidos y aminoácidos cumplen con las reglas
descritas en 37 C.F.R. §1.822.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las células Tr1 tienen un papel crítico en la
25 tolerancia periférica. Las células Tr1 son particularmente
importantes para limitar el daño de tejido al huésped durante
las respuestas inmunes inflamatorias. La generación de
células Tr1 acompaña las respuestas inmunes tanto TH1 como
TH2 in vivo e in vitro.

30 Las células Tr1 se generan de células T CD4⁺ naïve

000003

durante una respuesta inmune de células T conducida por antígeno. Las células Tr1 son anérgicas en respuesta a la señalización a través de receptores TCR, CD28 e IL-2 y tienen la capacidad de suprimir la proliferación conducida por antígeno de células T CD4⁺ naïve in vivo e in vitro. Las células Tr1 tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de enfermedades autoinmunes y limitar la magnitud de las respuestas inmunes a los patógenos microbianos.

Mientras que se han estudiado las señales moleculares que conducen a las células Tr1, poco se sabe acerca de las señales moleculares que regulan negativamente la generación de estas células. Aunque los fármacos inmunosupresores, citocinas, moléculas coestimulantes, y DCs se han implicado en la inducción de células Tr1, las señales que regulan negativamente la generación de células Tr1 siguen siendo difíciles de alcanzar.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La activación del receptor OX40 bloquea la generación de Tr1 de células T CD4⁺ de memoria o naïve así como también la producción de IL-10 de células Tr1 y la función inmunosupresora de las células Tr1. La activación del receptor OX40 también bloquea la producción de IL-10 por Células T-reg Foxp3⁺ y la función inmunosupresora. Como tal, presentados en la presente están anticuerpos de agonista que enlazan al receptor OX40, por lo que el agonista modula la activación del receptor OX40 para bloquear la secreción de citocina IL-10 y/o las células Tr1 y T-reg Foxp3⁺ en la función inmunosupresora total. Esencialmente, los anticuerpos pueden imitar el ligando OX40 y activar el receptor OX40 en

000004

células Tr1 y/o células T reguladoras naturales ("nTregs"), también referidas como "T-regs. Foxp3⁺"

Como se muestra en las solicitudes de patente co-
pendientes de los Estados Unidos Series Nos. 11/659,266 y
5 12/861,135, OX40L inhibe la generación y función de células
Tr1 que producen IL-10 de células T CD4⁺ naïve y de memoria
que fueron inducidas por los fármacos inmunosupresores
dexametasona y vitamina D3. Se descubrió que OX40L inhibe la
generación y función de células T reguladoras que producen
10 IL-10. Estos descubrimientos demuestran que la señalización
de OX40 por OX40L suprime la generación de Células T humanas
inmunosupresoras que producen IL-10 en cultivo. Esta función
única de OX40L no es compartida por otros dos miembros de la
familia de TNF coestimulantes, ligando GITR y ligando 4-1BB.
15 OX40L fuertemente también inhibe la generación y función de
células Tr1 que producen IL-10 inducidas por dos estímulos
fisiológicos proporcionados por DCs inmaduras y de ligando
co-estimulante inducible. La señalización del receptor OX40
en células T humanas por anticuerpos monoclonales, moléculas
20 pequeñas, o por el OX40L, o proteína que tiene al menos 90
por ciento de homología con estos, modula y regula la
generación y función de células T inmunosupresoras que
producen IL-10.

El descubrimiento se presta a numerosas
25 aplicaciones de tratamiento. Por ejemplo, anticuerpos
agonísticos, moléculas pequeñas o OX40L podrían ser
utilizados para suprimir la generación y la función de
células T inmunosupresoras que producen IL-10 y por lo tanto
podrían utilizarse para mejorar la respuesta inmune para
30 tratar cáncer y enfermedades infecciosas, o como un adyuvante.

000005

para vacunas contra cáncer. Los anticuerpos antagonistas para OX40 u OX40L, o moléculas pequeñas antagonistas, podrían utilizarse para mejorar la generación y la función de células T inmunosupresoras que producen IL-10 y por lo tanto podrían ser utilizados para el desarrollo de terapias para enfermedades autoinmunes y enfermedades de injerto versus huésped. Nuestro descubrimiento también proporciona métodos de alto rendimiento para la selección de anticuerpos o moléculas pequeñas activando ya sea el receptor OX40 (o por el contrario bloqueando la señalización de OX40) en las células T para el desarrollo de terapias para el cáncer, o alternativamente, enfermedades autoinmunes, y enfermedades de injerto versus huésped.

Los anticuerpos monoclonales y humanos (algunas veces referidos en la presente como un "anticuerpo anti-OX40" y/o otras variaciones del mismo) que enlazan el receptor OX40 humano se proporcionan en la presente. Estos anticuerpos son útiles en el tratamiento o prevención de enfermedades agudas o crónicas o afecciones cuya patología implica OX40. En un aspecto, se describe un anticuerpo humano aislado, o una porción de enlace de antígeno del mismo, que enlaza al OX40 humano y es efectivo como un tratamiento para el cáncer o tratamiento contra una enfermedad autoinmune. Cualquiera de los anticuerpos anti-OX40 descritos en la presente puede utilizarse como un medicamento. Uno o más de los anticuerpos anti-OX40 pueden utilizarse para tratar uno o más de una variedad de cánceres o enfermedades autoinmunes descritas en la presente.

Los anticuerpos humanizados aislados que enlazan al OX40 se proporcionan en la presente. Los anticuerpos aislados

000006

como se describe en la presente enlazan a OX40, y pueden enlazar a OX40 codificado de los genes siguientes: Número de Acceso de NCBI NP_003317, Número de Acceso de Genpept P23510, o genes que tienen 90 por ciento de homología con estos. El anticuerpo aislado proporcionado en la presente puede enlazar adicionalmente al receptor OX40 que tiene uno de los siguientes Número de Acceso de GenBank: AAB39944, CAE11757, o AAI05071.

Como se enseña en la presente, un ejemplo es un anticuerpo aislado el cual enlaza a OX40 que comprende: (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1; (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2; (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO. 3; (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO. 7; (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID No. 8; y (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO. 9.

Además, otro ejemplo es un anticuerpo aislado el cual enlaza a OX40 que comprende: (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 13; (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 14; (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO. 15; (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO. 19; (e) una región

000007

variable de cadena ligera CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO. 20; y (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO. 21.

5 Alternativamente, un anticuerpo aislado puede tener una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1 o 13; una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2 o 14; y/o una región variable de
10 cadena pesada CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 3 o 15, o una región variable de cadena pesada CDR que tiene 90 por ciento de homología con esta.

 Además, un anticuerpo aislado puede tener una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la
15 secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7 o 19; una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 8 o 20 y/o una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9 o 21, o una región variable de cadena pesada
20 que tiene 90 por ciento de homología con esta.

 El anticuerpo aislado puede tener una región variable de cadena ligera ("VL") que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 10, 11, 22 o 23, o una secuencia de aminoácidos con al menos 90 por ciento de identidad con
25 las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 10, 11, 22 o 23. El anticuerpo aislado puede tener una región variable de cadena pesada ("VH") que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 4, 5, 16 y 17, o una secuencia de aminoácidos con al menos 90 por ciento de identidad con las
30 secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 4, 5, 16 y 17. Como

000000

tal, como un ejemplo, el anticuerpo aislado puede comprender una secuencia pesada variable de SEC ID NO: 5 y una secuencia ligera variable de SEC ID NO: 11, o una secuencia que tiene 90 por ciento de homología con esta. De manera similar, el anticuerpo aislado puede tener una secuencia pesada variable de SEC ID NO: 17 y una secuencia ligera variable de SEC ID NO: 23 o una secuencia que tiene 90 por ciento de homología con esta.

El anticuerpo aislado puede tener cadena ligera variable codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEC ID NO: 12, o 24, o una secuencia de ácido nucleico con al menos 90 por ciento de identidad con las secuencias de nucleótidos de SEC ID NO: 12 o 24. El anticuerpo aislado puede tener cadena pesada variable codificada por una secuencia de ácido nucleico de SEC ID NO: 6 o 18, o una secuencia de ácido nucleico con al menos 90 por ciento de identidad con las secuencias de nucleótidos de SEC ID NO: 6 o 18.

En la presente también se proporcionan anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden tener una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 10 o 22, o una secuencia de aminoácidos con al menos 90 por ciento de identidad con las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 10 o 22. Además se proporcionan anticuerpos monoclonales que tienen una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 4 o 16, o una secuencia de aminoácidos con al menos 90 por ciento de identidad con las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 4 o 16.

En la presente también se proporciona un ácido

000009

nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-OX40 enseñados en la presente. Además en la presente se proporcionan células huéspedes, cada una comprende ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-OX40 descritos en la presente. Adicionalmente se proporcionan métodos para producir un anticuerpo (tal como la célula huésped que comprende ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-OX40 descritos en la presente) que comprenden cultivar la célula huésped de modo que el anticuerpo se produce, y/o recuperar el anticuerpo de la célula huésped.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

A fin que la manera en la cual las características, aspectos y ventajas de la invención citadas anteriormente, así como otras que llegarán a ser evidentes, se logre y se pueda entender en detalle, la descripción más particular de la invención brevemente resumida anteriormente se puede tener por referencia a las modalidades de la misma que se ilustran en las figuras que forman una parte de esta especificación. Se observará, sin embargo, que las figuras anexas ilustran algunas modalidades de la invención y, por lo tanto, no serán consideradas limitantes del alcance de la invención, para que la invención pueda admitir otras modalidades igualmente efectivas.

La FIG. 1 muestra que Tejidos de linfoma folicular (FL) humanos infiltrados con Tregs FOXP3⁺ y co-localizados con las células B de tumor y monocitos. Izquierda: Doble inmunotinción de Tregs FOXP3⁺ (rojo) y células de linfoma B CD20⁺ (verde); Derecha: Tregs FOXP3⁺ (rojo) y

000010

monocitos/macrófagos/DC CD11c⁺ (verde).

Las FIGS. 2A y 2B muestran números incrementados de Tregs CD4⁺FOXP3⁺ en pacientes con FL. Las células de tumor y PBMCs se obtuvieron de seis pacientes con FL en el diagnóstico inicial antes de la terapia. También se obtuvieron PBMCs de seis donantes normales para comparación. Los porcentajes de las células T reguladoras sobre células T CD4⁺ totales se determinaron por análisis citométrico de flujo de Tregs CD4⁺CD25⁺CD127^{baja}FOXP3⁺. La FIG. 2A muestra análisis FACS representativo de Tregs. PBMC de FL y células de tumor de FL se dividieron del mismo paciente. La FIG. 2B muestra el porcentaje de Tregs de todos los donantes. La barra horizontal indica medias.

La FIG. 3 muestra el aislamiento de Tregs ICOS⁺FOXP3⁺ o ICOS⁻FOXP3⁺ de FL. La suspensión de célula única se obtuvo de un espécimen de bazo antes de cualquier tratamiento. Las células se descongelaron en el día del ensayo. Células T CD4⁺CD8⁻CD14⁻CD16⁻CD56⁻CD11c⁻TCRγδ⁻ se dividieron en subconjuntos CD25^{baja} y CD25^{alta}. Las Tregs CD4⁺CD25^{alta}FOXP3⁺ adicionalmente se clasificaron en subconjuntos ICOS^{alta} e ICOS^{baja} con base en la expresión superficial de ICOS. En todos los subconjuntos se determinó la expresión intracelular de FOXP3.

La FIG. 4 muestra Tregs intratumorales que inhiben la proliferación de células T CD4⁺CD25⁻ infiltrantes en FL y la inhibición podría ser parcialmente bloqueada por anticuerpos de neutralización anti-IL-10. Las células T infiltrantes de tumor CD4⁺CD25⁻ etiquetadas con CFSE se cultivaron con células de tumor autólogas preactivadas por CD40L recombinante en la presencia o ausencia de Tregs

000011

ICOS⁺FOXP3⁺ o Tregs ICOS⁻FOXP3⁺, o anti-IL-10 (10 µg/ml). Después de 72 horas de cultivo, la proliferación de células CD4⁺CD25⁻ se determinó por análisis citométrico de flujo de dilución de CFSE.

5 La FIG. 5A muestra el análisis intracelular de la producción de citocina por células T CD4⁺ naïve como se determina por citometría de flujo de acuerdo con una modalidad de un método de la presente invención.

10 La FIG. 5B muestra la producción de citocina por células T CD4⁺ naïve como se determina por ELISA de acuerdo con una modalidad de un método de la presente invención.

15 La FIG. 5 muestra la función supresora por células Tr1 que producen IL-10 como se determina por la incorporación de [³H]timidina de acuerdo con una modalidad de un método de la presente invención.

La FIG. 6A muestra el análisis intracelular de la producción de citocina por células T CD4⁺ de memoria como se determina por citometría de flujo de acuerdo con una modalidad de un método de la presente invención.

20 La FIG. 6B muestra la producción de IL-10 por células T CD4⁺ de memoria como se determina por ELISA de acuerdo con una modalidad de un método de la presente invención.

25 La FIG. 7A muestra el análisis intracelular de la producción de citocina por células T CD4⁺ naïve como se determina por citometría de flujo de acuerdo con una modalidad de un método de la presente invención.

30 La FIG. 7B muestra la producción de IL-10 por células T CD4⁺ naïve como se determina por ELISA de acuerdo con una modalidad de un método de la presente invención.

000012

La FIG. 7C muestra el número de células T viables contadas de acuerdo con una modalidad de un método de la presente invención.

La FIG. 8A muestra el análisis intracelular de la
5 producción de citocina por células T CD4⁺ naïve como se determina por citometría de flujo de acuerdo con una modalidad de un método de la presente invención.

La FIG. 8B muestra la producción de IL-10 por
10 células T CD4⁺ naïve como se determina por ELISA de acuerdo con una modalidad de un método de la presente invención.

La FIG. 8C muestra el análisis intracelular de la
producción de citocina por células T CD4⁺ de memoria como se determina por citometría de flujo de acuerdo con una modalidad de un método de la presente invención.

15 La FIG. 8D muestra la producción de IL-10 por células T CD4⁺ de memoria como se determina por ELISA de acuerdo con una modalidad de un método de la presente invención.

La FIG. 8E muestra el análisis intracelular de la
20 producción de citocina por células T CD4⁺ naïve como se determina por citometría de flujo de acuerdo con una modalidad de un método de la presente invención.

La FIG. 8F muestra la producción de IL-10 por
25 células T CD4⁺ naïve como se determina por ELISA de acuerdo con una modalidad de un método de la presente invención.

La FIG. 9 muestra la producción de IL-10 por
células T reguladoras como se determina por ELISA de acuerdo con una modalidad de un método de la presente invención.

La FIG. 10 muestra los resultados de la selección
30 de sobrenadantes de hibridoma de OX40 anti-humano contra L-

000013

OX40 versus células L parentales como se determina por ELISA.

La FIG. 11 muestra la selección de anticuerpos monoclonales específicos de OX40 humano como se determina por análisis de citometría de flujo de acuerdo con una modalidad
5 de un método de la presente invención.

La FIG. 12 muestra la confirmación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-hOX40 mediante el uso de células SUPM2 que expresan OX40 (SUPM2-OX40) de acuerdo con una modalidad de un método de la
10 presente invención.

La FIG. 13 muestra anticuerpos monoclonales específicos de OX40 que pueden inhibir la generación de células que producen IL-10 (Tr1) de células T CD4⁺ estimuladas por vit D₃ (0.1 µM)/Dex (50 nm), CD32L/ICOSL y
15 anti-CD3/CD28 (0.2 µg/ml) de acuerdo con una modalidad de un método de la presente invención. Los datos de la Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia (FACS) se muestran en A y los porcentajes de células que producen IL-10 para todos los tratamientos de anticuerpos monoclonales
20 OX40 se muestran en B.

La FIG. 14 muestra los resultados que los anticuerpos monoclonales específicos de hOX40 que inhiben la generación de células Tr1 también estimulan la proliferación de células T CD4⁺ de acuerdo con una modalidad de un método
25 de la presente invención.

Las FIGS. 15A, 15B, y 15C detallan la titulación de anticuerpos monoclonales de OX40 para su capacidad de inhibir la generación de células Tr1 a partir de células T CD4⁺ de acuerdo con una modalidad de un método de la presente
30 invención. Los datos representativos de FACS se muestran en

000014

la FIG. 15A y el porcentaje de células Tr1 después del tratamiento con nueve anticuerpos monoclonales de OX40 se muestra en la FIG. 15B.

Las FIGS. 16A, 16B y 16C muestran que los anticuerpos monoclonales específicos de OX40 que inhiben la generación de células Tr1 que producen IL-10 a partir de células T CD4⁺ también inhiben la producción de IL-10 de Treg ICOS⁺CD4⁺CD25^{alta}CD127⁻ y función inmunosupresora. Las Tregs ICOS⁺CD4⁺CD25^{alta}CD127⁻ (ICOS⁺Tregs) recientemente clasificadas se estimularon con anti-CD3 (02 µg/ml) en la presencia de células de CD32L/ICOSL y células CD32L/OX40L (FIG. 16A) o anticuerpos monoclonales de OX40 o anticuerpo de control (FIG. 16B) durante cinco días. Las células luego se volvieron a estimular con anti-CD3/CD28 por 24 horas y los sobrenadantes se sometieron a ensayo por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). La FIG. 16C es un ensayo de proliferación basado en monocitos que muestra que dos de los anticuerpos bloquean la función de ICOS⁺Treg.

Las FIGS. 17A y 17B muestran la identificación de anticuerpos monoclonales anti-hOX40 que inhiben la generación de células Tr1 y bloquean la función de Treg FOXP3⁺CD4⁺CD25^{alta} de acuerdo con una modalidad de un método de la presente invención. Los análisis de citometría de flujo representativos se muestran en la FIG. 17A. Los datos para seis anticuerpos monoclonales se muestran en la FIG. 17B.

La FIG. 18 demuestra la identificación de los anticuerpos monoclonales anti-hOX40 que no inhiben la generación de células Tr1 pero bloquean la función de Treg FOXP3⁺CD4⁺CD25^{alta} de acuerdo con una modalidad de un método de la presente invención.

000015

Las FIGS. 19A y 19B muestran los anticuerpos agonistas anti-hOX40 que bloquean la función de Treg CD4⁺CD25^{alta} derivada de linfoma de acuerdo con una modalidad de un método de la presente invención. Los análisis de FACS representativos se muestran en la FIG. 19A y los datos para todos los experimentos se muestran en la FIG. 19B.

La FIG. 20 muestra que los anticuerpos monoclonales anti-hOX40 pueden enlazar células T CD4⁺ de mono rhesus. Como se muestra, seis de los mAbs anti-hOX40 pueden enlazar células T CD4⁺ activadas de mono rhesus y enlazarán OX40 de rhesus y activarán la señalización de OX40.

La FIG. 21 muestra que cada uno de los anticuerpos Hu106-222 Lote I y II del Ejemplo I está comprendido de una cadena pesada con un peso molecular de aproximadamente 50 kD y una cadena ligera con un peso molecular de aproximadamente 25 kD. La pureza de los anticuerpos Hu106-222 Lote I y II parece ser más de 95%.

La FIG. 22 muestra el análisis de anticuerpos 106-122, Ch106 y Hu106-222 (Lote II) de ratón para enlazar a células L/OX40 (Ejemplo I).

La FIG. 23 representa la estructura esquemática del vector de expresión para el anticuerpo Hu106 IgG1/kappa (Vector de expresión). Procediendo en el sentido de las manecillas del reloj desde el sitio SalI en la parte superior, el plásmido contiene la unidad de transcripción de cadena pesada iniciando con el promotor temprano inmediato principal de citomegalovirus humano (CMV) y mejorador (promotor de CMV) para iniciar la transcripción del gen de cadena pesada de anticuerpo. El promotor de CMV es seguido por el exón de VH, una secuencia genómica que contiene la

000016

región constante de cadena pesada gamma-1 humana que incluye los exones CH1, de bisagra, CH2 y CH3 con los intrones que intervienen, y el sitio de poliadenilación que sigue el exón CH3. Después de la secuencia de gen de cadena pesada, la
5 unidad de transcripción de cadena ligera comienza con el promotor de CMV, seguido por el exón de VL y una secuencia genómica que contiene el exón de región constante de cadena kappa humana (CL) con parte del intrón que le precede, y el sitio de poliadenilación que sigue el exón CL. El gen de
10 cadena ligera luego es seguido por el promotor temprano de SV40 (promotor de SV40), el gen de xantina guanina fosforribosil transferasa de E. coli (gpt), y un segmento que contiene el sitio de poliadenilación de SV40 (sitio de poli(A) de SV40). Finalmente, el plásmido contiene una parte
15 del plásmido pUC19, que comprende el origen bacteriano de replicación (pUC ori) y gen de beta-lactamasa (beta lactamasa). Las ubicaciones de sitios relevantes de enzima de restricción se muestran en la figura.

La FIG. 24 muestra la comparación entre los
20 anticuerpos Hu 106-222 Lote I y II para enlazar a células L/OX40 (Ejemplo I a continuación).

La FIG. 25 muestra que Hu1 19-122 está comprendido de una cadena pesada con un peso molecular de aproximadamente 50 kD y una cadena ligera con un peso molecular de
25 aproximadamente 25 kD. La pureza de Hu119 parece ser más de 95% (Ejemplo II a continuación).

La FIG. 26 muestra el resultado del análisis de FACS de anticuerpos Ch119-122 y Hu119-122 descritos en la presente (Ejemplo II a continuación).

30 La FIG. 27 muestra que el clon de mAb de OX40 anti-

000017

humano humanizado 119-122 (Hu119), y su anticuerpo mutado que
enlaza a FcR (Hu119-AA) mejoró la proliferación de células T
CD4⁺. Hu119-122 produjo mejor actividad estimulante de
células T en comparación con el mAb de OX40 anti-humano de
5 ratón parental (Ratón 119-122). Sin embargo, el mAb de OX40
anti-humano quimérico (Ch119, VH y VL de ratón pero regiones
constantes gamma-1 y kappa humanas) no mejoró la
proliferación de células T.

La FIG. 28 muestra que el clon de mAb de OX40 anti-
10 humano humanizado mutado que enlaza a FcR 106-222 (Hu222AA) y
clon de mAb de OX40 anti-humano quimérico 106-222 (Ch222)
mejoraron la proliferación de células T CD4⁺ naïve estimuladas
por anti-CD3. Estos anticuerpos tienen actividad estimulante
similar en comparación con el mAb de OX40 anti-humano de
15 ratón parental (Ratón 222). Sin embargo, el Ab de OX40 anti-
humano completamente humanizado, Hu222, no mejora la
proliferación de células T en comparación con IgG1 humana.

La FIG. 29A y B muestra que el clon de mAb de OX40
humanizado y anti-humano de ratón 119-122 bloquea la función
20 supresora de Treg CD4⁺.

La FIG. 30 proporciona datos que muestran que los
anticuerpos de OX40 anti-humanos mejoran la proliferación de
células T CD4⁺ y CD8⁺ usando anticuerpos unidos a la placa.

La FIG. 31 muestra que los anticuerpos de OX40
25 humanizados y anti-humanos de ratón requieren reticulación
para mejorar la proliferación de células T.

La FIG. 32 muestra que los anticuerpos de OX40
anti-humanos bloquean la actividad de Tregs CD4⁺FOXP3⁺n usando
anticuerpos de unión a la placa.

30 La FIG. 33 muestra que una alta concentración de

000018

anticuerpos de OX40 anti-humanos de ratón preferentemente matan Tregs FOXP3⁺.

La FIG. 34 muestra que los mAbs de OX40 anti-humanos de ratón actúan directamente ya sea sobre células T efectoras o nTregs para bloquear la función supresora de Tregs.

Las FIGS. 35A, 35B y 35C muestran los resultados del tratamiento de tumor de mAb anti-hOX40 en ratones transferidos adaptativamente con células T hOX40⁺CD8⁺. El mAb de OX40 anti-humano promueve la expansión y supervivencia de células T *in vivo*. El régimen de vacunación terapéutica se muestra en la FIG. 35A. Las imágenes representativas de bioluminiscencia *in vivo* se muestran en la FIG. 35B. Los resultados del tratamiento de tumor de anticuerpo se muestran en la FIG. 35C.

La FIG. 36 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de 106-222, 106-222 humanizado (Hu106), y se muestran las secuencias de VH de X61012 aceptoras humanas (número de acceso de GenBank). Los residuos de aminoácido se muestran en código de letra única. Los números arriba de las secuencias indican las ubicaciones de acuerdo con Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Las mismas secuencias como se reivindican en la presente también se proporcionan en el Listado de Secuencias y los números de posición pueden ser diferentes. En la Figura 36, las secuencias de CDR definidas por Kabat et al. (1991) son subrayadas en VH de 106-222. Los residuos de CDR en VH de X61012 se omiten en la figura. Las secuencias de VH humanas homólogas a los armazones de VH de

000019

106-222 se buscaron dentro de la base de datos de GenBank, y la secuencia de VH codificada por el ADNc de X61012 humano (VH de X61012) se eligió como una aceptora para la humanización. Las secuencias de CDR de VH de 106-222 primero
5 se transfirieron a las posiciones correspondientes de VH de X61012. A continuación, en las posiciones de armazón donde el modelo tridimensional de las regiones variables de 106-222 sugieren contacto significativo con las CDRs, los residuos de aminoácido de VH de 106-222 de ratón se sustituyeron por los
10 residuos humanos correspondiente. Estas sustituciones se realizaron en las posiciones 46 y 94 (subrayadas en HV de Hu106). Además, un residuo de armazón humano que se encontró que es atípico en el subgrupo de región V correspondiente se sustituyó con el residuo más típico para reducir la
15 inmunogenicidad potencial. Esta sustitución se realizó en la posición 105 (subrayada doble en VH de Hu106).

La FIG. 37 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de 106-222, 106-222 humanizado (Hu106), y se muestran las secuencias de VL de AJ388641 aceptoras humanas
20 (número de acceso de GenBank). Los residuos de aminoácido se muestran en código de letra única. Los números arriba de las secuencias indican las ubicaciones de acuerdo con Kabat et al. (1991). Las mismas secuencias como se reivindican en la presente también se proporcionan en el Listado de Secuencias
25 aunque los números de posición pueden ser diferentes. Las secuencias de CDR definidas por Kabat et al. (1) están subrayadas en VH de 106-222. Los residuos de CDR en VL de AJ388641 se omiten en la figura. Las secuencias de VL humanas homólogas a los armazones de VL de 106-222 se buscaron dentro
30 de la base de datos de GenBank, y la secuencia de VL

000020

codificada por el ADNc de AJ388641 humano (VL de AJ388641) se eligió como una aceptora para humanización. Las secuencias de CDR de VL de 106-222 se transfirieron a las posiciones correspondientes de VL de AJ388641. No se realizaron
5 sustituciones de armazón en la forma humanizada.

La FIG. 38 muestra la secuencia de nucleótidos del gen de VH de Hu106 flanqueado por los sitios SpeI y HindIII (subrayados) mostrada junto con la secuencia de aminoácidos deducida. Los residuos de aminoácido se muestran en código de
10 letra única. La secuencia de péptido señal está en cursiva. El residuo de aminoácido N-terminal (Q) de la VH madura está doble subrayado. Las secuencias de CDR de acuerdo con la definición de Kabat et al. (1991) están subrayadas. Las mismas secuencias como se reivindican en la presente también
15 se proporcionan en el Listado de Secuencias y los números de posición pueden ser diferentes en el Listado de Secuencias. La secuencia de intrón está en cursiva. El fragmento de gen de VH de Hu106 digerido con SpeI y HindIII se clonó entre los sitios correspondientes en el Vector de Expresión mostrado en
20 la Figura 23.

La FIG. 39 muestra la secuencia de nucleótidos del gen de VL de Hu106-222 flanqueado por sitios NheI y EcoRI (subrayados) mostrada junto con la secuencia de aminoácidos deducida. Los residuos de aminoácido se muestran en código de
25 letra única. La secuencia de péptido señal está en cursiva. El residuo de aminoácido N-terminal (D) de la VL madura está doble subrayado. Las secuencias de CDR de acuerdo con la definición de Kabat et al. (1991) están subrayadas. La secuencia de intrón está en cursiva. El fragmento de gen de
30 VL de Hu106 digerido con NheI y EcoRI se clonó entre los

000021

sitios correspondientes en el Vector de Expresión mostrado en la FIG. 23. Las mismas secuencias como se reivindican en la presente también se proporcionan en el Listado de Secuencias aunque los números de posición pueden ser diferentes en el

5 Listado de Secuencias.

La FIG. 40 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de 119-122, 119-122 humanizado (Hu119), y se muestran las secuencias de VH de Z14189 aceptoras humanas (número de acceso de GenBank). Los residuos de aminoácido se

10 muestran en código de letra única. Los números arriba de las secuencias indican las ubicaciones de acuerdo con Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Las secuencias de CDR

15 definidas por Kabat et al. (1991) están subrayadas en VH de 119-122. Los residuos de CDR en VH de Z14189 se omiten en la figura. Las secuencias de VH humanas homólogas a los armazones de VH de 119-122 se buscaron en la base de datos de GenBank, y la secuencia de VH codificada por el ADNc de

20 Z14189 humano (VH de Z14189) se eligió como una aceptora para humanización. Las secuencias de CDR de VH de 119-122 primero se transfirieron a las posiciones correspondientes de VH de Z14189. A continuación, en las posiciones de armazón donde el modelo tridimensional de las regiones variables de 119-122

25 sugirió contacto significativo con las CDRs, los residuos de aminoácido de VH de 119-122 de ratón se sustituyeron por los residuos humanos correspondientes. Estas sustituciones se realizaron en las posiciones 26, 27, 28, 30 y 47 (subrayadas en la secuencia de VH de Hu119) como se muestra en la figura.

30 Las mismas secuencias como se reivindican en la presente

000022

también se proporcionan en el Listado de Secuencias aunque los números de posición pueden ser diferentes en el Listado de Secuencias.

La FIG. 41 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de 119-122, 119-122 humanizado (Hu119), y se muestran las secuencias de VL de M29469 aceptoras humanas (Número de acceso de GenBank). Los residuos de aminoácido se muestran en código de letra única. Los números arriba de las secuencias indican las ubicaciones de acuerdo con Kabat et al. (1991). Las secuencias de CDR definidas por Kabat et al. (1) están subrayadas en VL de 119-122. Los residuos de CDR en VL de M29469 se omiten en la secuencia. Las secuencias de VL humanas homólogas a los armazones de VL de 119-122 se buscaron dentro de la base de datos de GenBank, y la secuencia de VL codificada por el ADNc de M29469 humano (VL de M29469) se eligió como un aceptor para humanización. Las secuencias de CDR de VL de 119-122 se transfirieron a las posiciones correspondientes de VL de M29469. No fueron necesarias sustituciones de armazón en la forma humanizada. Las mismas secuencias como se reivindican en la presente también se proporcionan en el Listado de Secuencias aunque los números de posición pueden ser diferentes en el Listado de Secuencias.

La FIG. 42 muestra la secuencia de nucleótidos del gen de VH de Hu119 flanqueado por los sitios SpeI y HindIII (subrayados) mostrada junto con la secuencia de aminoácidos deducida. Los residuos de aminoácido se muestran en código de letra única. La secuencia de péptido señal está en cursiva. El residuo de aminoácido N-terminal (E) de la VH madura es doble subrayado. Las secuencias de CDR de acuerdo con la

000023

definición de Kabat et al. (1991) están subrayadas. La secuencia de intrón está en cursiva. El fragmento de gen de VH de Hull19 digerido con SpeI y HindIII se clonó entre los sitios correspondientes en el Vector de Expresión mostrado en la FIG. 23. Las mismas secuencias como se reivindican en la presente también se proporcionan en el Listado de Secuencias aunque los números de posición pueden ser diferentes en el Listado de Secuencias.

La FIG. 43 muestra la secuencia de nucleótidos del gen de VL de Hull19 flanqueado por los sitios NheI y EcoRI (subrayados) mostrada junto con la secuencia de aminoácidos deducida. Los residuos de aminoácido se muestran en código de letra única. La secuencia de péptido señal está en cursiva. El residuo de aminoácido N-terminal (E) de la VL madura es doble subrayado. Las secuencias de CDR de acuerdo con la definición de Kabat et al. (1991) están subrayadas. La secuencia de intrón está en cursiva. El fragmento de gen de VL de Hull19 digerido con NheI y EcoRI se clonó entre los sitios correspondientes en el Vector de Expresión mostrado en la FIG. 23. Las mismas secuencias como se reivindican en la presente también se proporcionan en el Listado de Secuencias aunque los números de posición pueden ser diferentes en el Listado de Secuencias.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El término "anticuerpos" incluye una molécula de inmunoglobulina comprendida de cuatro cadenas de polipéptido, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada está comprendida de una región variable de cadena pesada

000024

(abreviada en la presente como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está comprendida de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está comprendida de una región variable de

5 cadena ligera (abreviada en la presente como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones

10 determinantes de complementariedad (CDRs), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones de armazón (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs, arregladas de amino-término a carboxi-término en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

15 El término "porción de enlace de antígeno" de un anticuerpo (o "porción de anticuerpo") incluye fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de enlazar específicamente un antígeno (por ejemplo, hOX40). Se ha mostrado que la función de enlace de antígeno de un

20 anticuerpo se puede realizar por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de enlace abarcados dentro del término "porción de enlace de antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH1;

25 (ii) un fragmento de $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente de disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un brazo único de un

30 anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature

000025

341:544-546), que consiste de un dominio VH; y (vi) una
región determinante de complementariedad (CDR) aislada.
Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se
codifican por genes separados, pueden estar unidos,
5 utilizando métodos recombinantes, por un enlazante sintético
que les permite estar hecho como una cadena de proteína única
en la cual las regiones VL y VH se aparean para formar
moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única
(scFv); ver por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-
10 426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena única también se
proponen ser abarcados dentro del término "porción de enlace
de antígeno" de un anticuerpo. También se abarcan otras
formas de anticuerpos de cadena única, tales como diacuerpos.
15 Los diacuerpos son anticuerpos biespecíficos, bivalentes en
los cuales los dominios VH y VL se expresan en una cadena de
polipéptido único, pero usando un enlazante que es demasiado
corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en
la misma cadena, forzando a los dominios a aparearse con
20 dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios
de enlace de antígeno (ver por ejemplo, Holliger, P., et al.
(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.
J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Aún adicionalmente,
un anticuerpo o porción de enlace de antígeno del mismo puede
25 ser parte de unas moléculas de inmunoadhesión grandes,
formadas por asociación covalente o no covalente del
anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más otras
proteínas o péptidos. Los ejemplos de tales moléculas de
inmunoadhesión incluyen el uso de la región de núcleo de
30 estreptavidina para producir una molécula de scFv tetramérica.

000026

(Kipriyanov, S. M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) y el uso de un residuo cisteína, un péptido marcador y una marca de polihistidina C-terminal para producir moléculas de scFv bivalente y biotinilado
5 (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Las porciones de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, se pueden preparar de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tal como digestión de papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además,
10 los anticuerpos, porciones de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión se pueden obtener usando técnicas estándares de ADN recombinante, como se describe en la presente. Las porciones de enlace de antígeno preferidas son dominios completos o pares de dominios completos.

15 OX40/OX40-ligando (Receptor de OX40)/(OX40L) son un par de moléculas coestimulantes críticas para la proliferación de células T, supervivencia, producción de citocina, y generación de células de memoria. Los experimentos in vitro tempranos demostraron que la
20 señalización a través de OX40 en células T CD4⁺ condujo a TH2, pero ningún desarrollo de TH1. Estos resultados se soportaron por estudios in vivo que muestran que el bloqueo de la interacción de OX40/OX40L previno la inducción y mantenimiento de respuestas inmunes alérgicas mediadas por
25 TH2. Sin embargo, el bloqueo de la interacción de OX40/OX40L alivia o previene las enfermedades mediadas TH1. Además, la administración de OX40L soluble o transferencia de gen de OX40L en tumores mostró que mejora fuertemente la inmunidad anti-tumor en ratones. Los estudios recientes también
30 sugieren que OX40/OX40L puede jugar un papel en la promoción

000027

de respuestas inmunes mediadas por células T CD8. Como se discute en la presente, la señalización de OX40 bloquea la función inhibidora de células T reguladoras que se presentan naturalmente CD4⁺CD25⁺ y el par OX40/OX40L juega un papel
5 fundamental en la regulación global de inmunidad periférica versus tolerancia.

Los términos "numeración Kabat", "definiciones Kabat" y "etiquetado Kabat" se usan indistintamente en la presente. Estos términos, los cuales son reconocidos en el
10 arte, se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos los cuales son más variables (es decir hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o un fragmento de enlace de antígeno del mismo
15 (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 y, 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).

La frase "anticuerpo humano recombinante" incluye
20 anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, anticuerpos aislados de una genoteca de anticuerpo humano combinatorio, recombinante, anticuerpos
25 aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (ver por ejemplo, Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que involucra el empalme de
30 secuencias de gen de inmunoglobulina humana a otras

000028

secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (ver 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).

Un "anticuerpo aislado" incluye un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que específicamente enlaza hOX40 sustancialmente está libre de anticuerpos que específicamente enlazan antígenos distintos de hOX40). Un anticuerpo aislado que específicamente enlaza hOX40 puede enlazar moléculas de OX40 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

El término "actividad" incluye actividades tal como la especificidad/afinidad de enlace de un anticuerpo para un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo OX40 anti-humano que enlaza un antígeno OX40 y/o la potencia de activación de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-OX40 cuyo enlace al receptor hOX40 activa la actividad biológica de hOX40 o activación de enlace del receptor en un ensayo de células L/OX40 humanas.

El término " K_{off} ", como se usa en la presente, se propone para referirse a la constante de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno. El término " K_d ", como se usa en la presente, se propone para referirse a la constante de disociación de una interacción de anticuerpo-antígeno

000029

particular.

La frase "resonancia de plasmón de superficie" incluye un fenómeno óptico que permite el análisis de las interacciones bioespecíficas en tiempo real por detección de las alteraciones en las concentraciones de proteína dentro de una matriz de biosensor, por ejemplo, utilizando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.). Para descripciones adicionales, ver Ejemplo 5 y Jonsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; y Johnsson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277.

El término "vector" incluye una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", el cual se refiere a un bucle de ADN de doble cadena circular en el cual los segmentos de ADN adicionales se pueden ligar. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la cual se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped en la introducción en la célula huésped, y así se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales se enlazan operativamente. Tales vectores son referidos en la presente como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente,

000030

"vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en la forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse
5 indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada. Sin embargo, la invención se propone que incluya otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, adenovirus y virus adeno-asociados), los cuales
10 cumplen funciones equivalentes.

La frase "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped") incluye una celda en la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que tales términos pretenden referirse no sólo a
15 la célula objeto particular, sino a la progenie de tal célula. Debido a que pueden ocurrir ciertas modificaciones en las generaciones venideras debido ya sea a la mutación o influencias ambientales, tal progenie, de hecho, no puede ser idéntica a la célula de origen, pero aún se incluye dentro
20 del alcance del término "célula huésped" como se usa en la presente.

El término "anticuerpo monoclonal" (anticuerpo monoclonal) se refiere a un anticuerpo, o población de anticuerpos similares, obtenidos de una población de
25 anticuerpos sustancialmente homogéneos, y no será interpretado como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular, incluyendo pero no limitado a, anticuerpos monoclonales que se pueden hacer por el método de hibridoma primero descrito por Kohler and Milstein
30 (Nature, 256: 495-497, 1975), o por métodos de ADN

000031

recombinante.

El término "anticuerpo quimérico" (o "inmunoglobulina quimérica") se refiere a una molécula que comprende una cadena pesada y/o ligera la cual es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como también fragmentos de tales anticuerpos, siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada (Cabilly et al (1984), infra; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. sci. U.S.A. 81:6851).

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a las formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no-humanos (por ejemplo, murinos) así como también anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado puede incluir sustituciones de aminoácidos conservadoras o residuos no naturales de las mismas o diferentes especies que no alteran significativamente su actividad biológica y/o enlace. Tales anticuerpos son anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulinas no humanas. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor son reemplazados por los residuos de una CDR de una especie no-humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, camello, bovino, cabra, o conejo que tiene las propiedades deseadas. Además, los anticuerpos humanizados

000032

pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o armazón importadas. Estas modificaciones se realizan para adicionalmente refinar y maximizar el rendimiento del anticuerpo. Así, en general, un anticuerpo humanizado comprenderá todos o sustancialmente todos de al menos uno, y en un aspecto dos, dominios variables, en los cuales todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), o aquella de una inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, Cabilly et al., Patente de Estados Unidos. No. 4,816,567; Cabilly et al., Patente Europea No. 0,125,023 B1; Boss et al., Patente de Estados Unidos No. 4,816,397; Boss et al., Patente Europea No. 0,120,694 B1; Neuberger, M. S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M. S. et al., Patente Europea No. 0,194,276 B1; Winter, Patente de Estados Unidos No. 5,225,539; Winter, Patente Europea No. 0,239,400 B1; Padlan, E. A. et al., Solicitud de Patente Europea No. 0,519,596 A1; Queen et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 86:10029-10033).

Cada uno de los anticuerpos descritos y reivindicados en la presente se pueden referir, en singular o plural, como: "anticuerpo anti-OX40"; "anticuerpo anti-hOX40"; "anticuerpo monoclonal anti-hOX40"; "anticuerpo OX40 anti-humano"; "mAb OX40 anti-humano"; "mAb anti-hOX40"; "anticuerpo monoclonal específico de hOX40"; "anticuerpo anti-OX40L"; "anticuerpo anti-hOX40L"; "anticuerpo OX40L

000033

anti-humano"; "anticuerpo específico de OX40 humano";
 "anticuerpo monoclonal específico de OX40 humano";
 "anticuerpo específico de OX40 humano"; "anticuerpo
 específico de OX40 anti-humano"; "anticuerpo monoclonal
 5 específico de OX40 anti-humano"; "anticuerpo específico de h-
 OX40"; "anticuerpo monoclonal específico de h-OX40";
 "anticuerpo agonista de hOX40"; "agonista de hOX40" y/u otras
 variaciones similares de los mismos.

Como se describe en la Solicitud de Patente de
 10 Estados Unidos No. 11/659,266 titulada "Methods to Treat
 Disease States by Influencing the Signaling of OX-40-
 Receptors and High Throughput Screening Methods and
 Identifying Substrates Thereof" la cual se incorpora en la
 presente por referencia, se descubrió que una función de
 15 OX40L es la regulación negativa de la generación de células
 Tr1 inducida por agentes inmunosupresores Dex y vit D3,
 ICOSL, o DCs inmaduras. Este descubrimiento demuestra un
 mecanismo general por el cual OX40L mejora inmunidad y rompe
 la tolerancia inmunológica.

20 Con el uso de análisis inmunohistológico (FIG. 1),
 la tinción intracelular (FIG. 2), y clasificación de células
 (FIG. 3), se ha mostrado que tanto las Tregs que producen
 ICOS⁺IL-10 como Tregs que producen ICOS-TGF- β se infiltran en
 tejidos de FL humanos. Estas Tregs FOXP3⁺ derivadas de FL
 25 pueden inhibir fuertemente la proliferación de células T
 infiltrantes de tumor FOXP3⁻CD4⁺CD25⁻ en respuesta a células
 de linfoma autólogas pre-activadas de ligando CD40⁻ (FIG. 4).
 La actividad supresora de Tregs ICOS⁺ podría ser parcialmente
 bloqueada por un anticuerpo anti-IL-10 neutralizante,
 30 confirmando el papel de Tregs que producen ICOS⁺IL-10 en FL

000034

(FIG. 4). En el experimento de la FIG. 2, las células de tumor y PBMCs se obtuvieron de 7 pacientes con un diagnóstico inicial antes de la terapia. Las PMBC también se obtuvieron de 7 donantes sanos para comparación. Los porcentajes de las células T reguladoras sobre células T CD4⁺ totales se determinaron mediante análisis citométrico de flujo de Tregs CD4⁺CD25⁺CD127^{baja}FOXP3⁺. La FIG. 2A proporciona análisis FACS representativo de Tregs, mientras que la FIG. 2B muestra el porcentaje de Tregs de todos los donantes.

También se descubrió que OX40L inhibe la generación de células Tr1 de células T CD4⁺ inducida por Dex y vit D3. Se sabe que una combinación de fármacos inmunosupresores Dex y vit D3 consistentemente induce la diferenciación de células T CD4⁺ naïve en células Tr1. Para investigar si OX40L puede inhibir la generación y la función de células Tr1, las células T CD4⁺ naïve se cultivaron con anticuerpos monoclonales anti-CD3 más anti-CD28 en la presencia o ausencia de células L transfectadas con OX40L en cuatro diferentes condiciones de cultivo incluyendo: (1) Tr1 (Dex y vit D3); (2) TH1 (IL-12); (3) TH2 (IL-4); o (4) neutral (solo medio) durante 7 días (FIG. 5A). La producción de IL-10 por las células T cebadas se analizó mediante tinción de citocina intracelular y ELISA.

En los experimentos de la FIG. 5A, un análisis intracelular de la producción de citocina por células T CD4⁺ naïve se realizó mediante citometría de flujo. Las células T CD4⁺ naïve se cultivaron con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 en la presencia de IL-2 en células L parentales o células OX40L-L con las citocinas recombinantes o reactivos indicados durante 7 días. Los porcentajes de las

000035

células T que producen citocina respectivas se indican en cada perfil de mancha de punto. Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de células Tr1 a partir de células T CD4⁺ naïve inducida por las diferentes señales de polarización. Como se muestra en la FIG. 5A, entre 2% a 4% de células Tr1 se generaron de células T CD4⁺ naïve cultivadas en condiciones neutrales o TH1 o TH2. Más de 15% de células Tr1 se generaron en cultivo con Dex más vit D3. La adición de OX40L completamente bloqueó la generación de células Tr1, mientras promovió la generación de células T que producen TNF- α en todas las condiciones de cultivo.

Estos datos fueron confirmados por datos de ELISA (FIG. 5B). En los experimentos de la FIG. 5B, la producción de citocina por células CD4⁺ naïve en sobrenadantes después de la reestimulación con los anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 horas se midió mediante ELISA. Las células T CD4⁺ naïve se cultivaron con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 en la presencia de IL-2 en células L parentales o células OX40L-L con las citocinas recombinantes o reactivos indicados durante 7 días. Los datos se muestran como media $\pm$ error estándar de la media (SEM) de cuatro experimentos independientes. Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de células Tr1 a partir de células T CD4⁺ naïve inducida por las diferentes señales de polarización.

Las células T CD4⁺ naïve cebadas con condición de Tr1 (Dex más vit D3) fueron anérgicas y tuvieron la capacidad de suprimir la proliferación de células T CD4⁺ naïve en respuesta a los anticuerpos monoclonales anti-CD3 más anti-CD28 (FIG. 5). En los experimentos de la FIG. 5, la función

000036

supresora en las células T se midió por incorporación de [³H]timidina. Las mezclas de las poblaciones de células T indicadas se volvieron a estimular por los anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28. Las barras de error
5 representan la SEM de cavidades por triplicado. Se descubrió que las células T CD4⁺ naïve cebadas con la misma condición de Tr1 en la presencia de OX40L proliferaron vigorosamente y no inhibieron la proliferación de células T CD4⁺ naïve en respuesta a los anticuerpos monoclonales anti-CD3 más anti-
10 CD28. Los datos sugieren que OX40L bloquea la generación de células Tr1 funcionales a partir de células T CD4⁺ naïve inducida por Dex y vit D3.

Se descubrió que las células Tr1 pueden generarse a partir de células T CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ de memoria, y que OX40L
15 puede inhibir la generación de células Tr1 a partir de células T CD4⁺ de memoria. Las células T CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ de memoria se cultivaron durante 7 días con los anticuerpos monoclonales anti-CD3 más anti-CD28 en la presencia o ausencia de condición de Tr1 de células L transfectadas con
20 OX40L (Dex más vit D3). En los experimentos de la FIG. 6A, un análisis intracelular de la producción de citocina por células T CD4⁺ de memoria se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Las células T CD4⁺CD45RO⁺CD25 de memoria se cultivaron con los anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-
25 CD28, e IL-2 en células L parentales o células OX40L-L en la presencia o ausencia de Dex más vit D3 durante 7 días. Los porcentajes de las células T que producen citocina respectivas se indican en cada perfil de mancha de punto. Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de células
30 Tr1 de células T CD4⁺ de memoria bajo una condición con Dex

000037

más vit D3. La FIG. 6A muestra que se generaron número grandes de células Tr1 (> 20%) a partir de células T CD4⁺ de memoria en cultivo con Dex más vit D3. La adición de OX40L bloqueó completamente la generación de células Tr1 y promovió la generación de células que producen TNF- α a partir de células T CD4⁺ de memoria.

La capacidad de Dex más vit D3 para promover la producción de IL-10 a partir de células T CD4⁺ de memoria, y que esta capacidad puede ser inhibida por OX40L, se confirmó por análisis de ELISA de IL-10 (FIG. 6B). En los experimentos de la FIG. 6B, la producción de IL-10 por células T CD4⁺ de memoria se midió en sobrenadantes después de la reestimulación con los anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 h por ELISA. Los datos se muestran como media $\pm$ SEM de cuatro experimentos independientes. Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de células Tr1 a partir de células T CD4⁺ de memoria bajo una condición con Dex más vit D3.

Además se descubrió que OX40L inhibe la generación de células Tr1, mientras que otros miembros de la familia de TNF (GITRL y 4-1BBL) no. Dentro de la superfamilia de TNF, OX40L, ligando de receptor de TNF inducido por glucocorticoide (GITRL), y ligando de 4-1BB (4-1BBL) tienen función coestimulante para células T. Para investigar si OX40L fue el único en la inhibición de células Tr1, las células T CD4⁺ naïve se cultivaron con anticuerpos monoclonales anti-CD3 más anti-CD28 con Dex más vit D3, con células L parentales o células L transfectadas con OX40L, GITRL, o 4-1BBL durante 7 días. Mientras que OX40L, GITRL, y 4-1BBL todos promovieron la generación de células que

000038

producen TNF- α , solamente OX40L inhibió la generación de células Tr1 (FIGS. 7A y 7B).

En los experimentos de la FIG. 7A, un análisis intracelular de la producción de citocina por células T CD4⁺ naïve se realizó mediante citometría de flujo. Las células T CD4⁺ naïve se cultivaron con los anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD28, e IL-2 en células L parentales, células OX40L-L, células GITRL-L, o células 4-1BBL-L en la presencia de Dex más vit D3 durante 7 días. Los porcentajes de las células T que producen citocina respectivas se indican en cada perfil de mancha de punto. Los resultados muestran que OX40L pero no GITRL ni 4-1BBL inhibe la generación de células Tr1.

En los experimentos de la FIG. 7B, IL-10 por células CD4⁺ naïve se midió en sobrenadantes después de la reestimulación con los anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 h por ELISA. Los datos se muestran como media $\pm$ SEM de cuatro experimentos independientes. Los resultados muestran que OX40L pero no GITRL ni 4-1BBL inhibe la generación de células Tr1.

OX40L, GITRL y 4-1BBL todos promovieron la expansión de números totales de células T (FIG. 7C). En los experimentos de la FIG. 7C, se contó el número de células T viables. Los datos se muestran como media $\pm$ SEM de cuatro experimentos independientes.

Como es entendido por aquellos de experiencia en el arte, los resultados de las FIGS. 7A, 7B y 7C muestran que OX40L, pero no GITRL ni 4-1BBL, inhibe la generación de células Tr1. Estos datos sugieren que entre los tres miembros de la superfamilia de TNF se sabe que coestimulan las células

000039

T, OX40L tiene una nueva y única función en la inhibición de la generación de células Tr1.

Además se descubrió que OX40L inhibe la generación de células Tr1 inducida por ICOSL o DCs inmaduras. ICOS y CD28 representan los dos receptores coestimulantes positivos dentro de la familia CD28 expresados en las células T. La señalización a través de ICOS por anticuerpos agonistas o ICOSL se ha mostrado que promueve las células T CD4⁺ para producir IL-10. Para investigar si OX40L puede inhibir la capacidad de ICOS para inducir la producción de IL-10 por células T CD4⁺, las células T CD4⁺ naïve y de memoria se cultivaron con anti-CD3 en la presencia de células L transfectadas con ICOSL o células L transfectadas con ICOSL en la presencia de OX40L durante 7 días.

En los experimentos de la FIG. 8A, un análisis intracelular de la producción de citocina por células T CD4⁺ naïve se realizó mediante citometría de flujo. Las células T CD4⁺ naïve se cultivaron durante 7 días en células L parentales, en una mezcla de células ICOSL-L y células L, o en una mezcla de células ICOSL-L y células OX40L-L, las cuales fueron pre-recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-CD3. Los porcentajes de las células T que producen citocina respectivas se indican en cada perfil de mancha de punto. Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de células Tr1 a partir de células T CD4⁺ naïve inducida por ICOSL.

En los experimentos de la FIG. 8B, la producción de IL-10 por células CD4⁺ naïve se midió en sobrenadantes después de la reestimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 por 24 h se midió mediante ELISA. Las células T CD4⁺ naïve se cultivaron durante 7 días en células

000040

L parentales, en una mezcla de células ICOSL-L y células L, o en una mezcla de células ICOSL-L y células OX40L-L, las cuales fueron pre-recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-CD3. Los datos se muestran como media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes. Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de células Tr1 a partir de células T CD4⁺ naïve inducida por ICOSL.

En los experimentos de la FIG. 8C, un análisis intracelular de la producción de citocina por células T CD4⁺ de memoria se realizó mediante citometría de flujo. Las células T CD4⁺ de memoria se cultivaron durante 7 días en células L parentales, en una mezcla de células ICOSL-L y células L, o en una mezcla de células ICOSL-L y células OX40L-L, las cuales fueron pre-recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-CD3. Los porcentajes de las células T que producen citocina respectivas se indican en cada perfil de mancha de punto. Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de células Tr1 a partir de células T CD4⁺ de memoria inducida por ICOSL.

En los experimentos de la FIG. 8D, la producción de IL-10 por células T CD4⁺ de memoria en sobrenadantes después de la reestimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 por 24 h se midió mediante ELISA. Las células T CD4⁺ de memoria se cultivaron durante 7 días en células L parentales, en una mezcla de células ICOSL-L y células L, o en una mezcla de células ICOSL-L y células OX40L-L, las cuales fueron pre-recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-CD3. Los datos se muestran como media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes. Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de células Tr1 a partir de células

000041

T CD4⁺ de memoria inducida por ICOSL.

Los resultados de los experimentos de las FIGS. 8A, 8B, 8C, y 8D muestran que ICOSL promueve significativamente la generación de células Tr1 a partir tanto de células T CD4⁺ naïve como de memoria. La adición de OX40L inhibe completamente la generación de células Tr1 a partir tanto de células T CD4⁺ naïve como de memoria, mientras promueve fuertemente la generación de células que producen TNF- α .

Se sabe que las DCs inmaduras o DCs tratadas con IFN- α o IL-10 pueden inducir células T CD4⁺ naïve para diferenciarse en células Tr1. Se investigó si OX40L podría inhibir la generación de células Tr1 inducida por DCs. Como se muestra en la FIG. 8E, las DCs inmaduras o DCs tratadas con IL-10 o IFN- α todas inducen la generación de más de 10% de células Tr1 a partir de células T CD4⁺ naïve. Por el contrario, las DCs activadas por CD40L inducen una fuerte respuesta de TH1, acompañada por la generación de aproximadamente 3% de células Tr1. La adición de OX40L recombinante en cultivos de células DC-T inhibe completamente la generación de células Tr1 inducida por DCs inmaduras y DCs tratadas con IL-10 e IFN- α . Además, OX40L también inhibe la generación del número residual de células Tr1 inducida por las DCs maduras activadas por CD40L. En los experimentos de la FIG. 8E, un análisis intracelular de la producción de citocina por células T CD4⁺ naïve se realizó mediante citometría de flujo. Las células T CD4⁺ naïve se co-cultivaron en la presencia o ausencia de OX40L recombinante soluble durante 7 días con DCs inmaduras o DCs cultivadas con IFN- α , IL-10, y CD40L. Los porcentajes de las células T que producen citocina respectivas se indican en cada perfil de

000042

mancha de punto. Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de células Tr1 de células T CD4⁺ inducida por DCs.

La capacidad de OX40L para inhibir la generación de células Tr1 inducida por DCs se confirmó por los datos de ELISA (FIG. 8F). En los experimentos de la FIG. 8F, la producción de IL-10 por células CD4⁺ naïve se midió en sobrenadantes después de la reestimulación con los anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 h por ELISA. Las células T CD4⁺ naïve se co-cultivaron en la presencia o ausencia de OX40L recombinante soluble durante 7 días con DCs inmaduras o DCs cultivadas con IFN- α , IL-10, y CD40L. Los datos se muestran como media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes. Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de células Tr1 a partir de células T CD4⁺ inducida por DCs. Por lo tanto, estos datos demuestran que OX40L podría inhibir la generación de células Tr1 inducida por más señales fisiológicas proporcionadas por ICOSL y DCs.

Se ha sugerido previamente que las células T reguladoras están altamente representadas en el área de linfoma no de Hodgkin de células B y que las células B están involucradas en el reclutamiento de células T reguladoras en el área del linfoma. Se investigó si la influencia en la señalización de receptores OX40, tal como por OX40L, podría proporcionar una terapia contra el linfoma de células B. Las muestras criopreservadas de pacientes con linfoma de células B se utilizaron para estimar la capacidad de OX40L para cerrar las células Tr1. Las muestras utilizadas fueron linfoma folicular obtenido de un espécimen de bazo previo a cualquier tratamiento. Las células se descongelaron, con

000043

400×10⁶ células congeladas que produjeron 127×10⁶ células vivas y 33.9×10⁶ células muertas (79% de viabilidad). Un número suficiente de células CD25⁺ se identificaron por tinción de FACS. En los experimentos de la FIG. 9, la secreción de IL-10 de Tregs que producen ICOS⁺IL-10 se determinó por ELISA. Las células Treg se cultivaron bajo dos condiciones diferentes. En la condición 1, las células CD25⁺/ICOS⁺ se cultivaron con anti-CD3 en la presencia de IL-2 (900 µl/ml) en células L parentales o células OX40L-L con anticuerpo anti-ICOS durante 3-6 días. En la condición 2, las células CD25⁺/ICOS⁺ se cultivaron con anti-CD3 en la presencia de IL-2 (900 µl/ml) en células ICOS-L-L o una mezcla de células OX40L-L e ICOS-L-L durante 3-6 días. La producción de citocina en los sobrenadantes se midió mediante ELISA. Los resultados muestran que OX40L inhibe grandemente la producción de IL-10 por células Treg.

Los hallazgos, que OX40L tiene la capacidad de inhibir la generación y función de células Tr1 inducidas por los fármacos inmunosupresores Dex más vit D3, ICOSL, o DCs, destacan un nuevo mecanismo por el cual OX40L promueve la inmunidad y rompe la tolerancia durante diferentes formas de respuestas inmunes mediadas por CD4- o CD8-, como se entendería por uno de experiencia en el arte. La capacidad de OX40L para inhibir la generación de células Tr1 durante ambas respuestas de TH1 inducida por IL-2 o TH2 inducida por IL-4 sugiere que OX40L puede controlar la magnitud de las respuestas inmunes mediadas por TH1 o TH2. Además, la capacidad de OX40L para inhibir la generación de células Tr1 parece ser una propiedad única de OX40L, debido a que los otros dos miembros de la familia de TNF, GITRL y 4-1BBL no

000044

tienen esta propiedad funcional. Además, la capacidad de OX40L para inhibir la producción de IL-10 por células Treg identifica OX40L como un potente tratamiento para el linfoma de células B y otros cánceres.

5 Se han identificado muchas moléculas que promueven la generación de células Tr1, incluyendo IL-10, IFN- α , ICOSL y compuestos inmunosupresores tales como Dex más vit D3. OX40L representa un potente inhibidor para la generación de células Tr1 no sólo de células T CD4⁺ naïve, sino también de
10 células T CD4⁺ de memoria y células T reguladoras. Esta nueva propiedad de OX40/OX40L puede explicar un reporte reciente que muestra que la señalización de OX40 permite que las células T auroreactivas anérgicas adquieran las funciones de células efectoras. La , dirección de OX40/OX40L por
15 consiguiente proporciona tratamientos para enfermedades alérgicas y autoinmunes humanas y así como también para el desarrollo de tratamientos para enfermedades infecciosas humanas y cáncer incluyendo, pero no limitado a melanoma, cáncer de cerebro, cáncer de huesos, leucemia, linfoma,
20 neoplasia derivada de células epiteliales (carcinoma epitelial) tal como carcinoma de células basales, adenocarcinoma, cáncer gastrointestinal tal como cáncer de labios, cáncer de la boca, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado y cáncer de estómago, cáncer de colon,
25 cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de ovarios, cáncer cervical, cáncer de pulmón, cáncer de mama y cáncer de piel, tales como células escamosas y cánceres de células basales, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, y otros cánceres conocidos.

30 Los trastornos o afecciones que se pueden prevenir

. 000045

o tratar por los anticuerpos y métodos descritos en la presente incluyen la prevención o tratamiento de cáncer, tal como leucemia de células T cutánea, tumores de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, gliomas de alto
5 grado, metástasis de cerebro, melanoma, cáncer de piel, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, leucemia, síndrome mielodisplásico (una afección de pre-leucemia), y mieloma múltiple. En general, la metástasis de cualquier cáncer se puede prevenir o tratar con los
10 métodos y compuestos descritos en la presente. Los anticuerpos también se pueden utilizar para prevenir o tratar afecciones angiogénicas proliferativas incluyendo telangectasia, angiomas venosos, hemangioblastoma. Otros trastornos, enfermedades o afecciones incluyen enfermedades
15 virales, algunas de las cuales se pueden considerar tradicionalmente "intratables". Los anticuerpos, por ejemplo, también se pueden utilizar para clasificar las cepas de un solo patógeno. Los investigadores pueden utilizar los anticuerpos descritos en la presente para identificar y
20 rastrear las células o moléculas específicas en el organismo.

En general, los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en los mamíferos que típicamente se caracteriza por el crecimiento celular no regulado. Más específicamente, los cánceres que se pueden
25 tratar o prevenir usando uno o más de los anticuerpos descritos en la presente o una variante de los mismos, incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de células
30 escamosas, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de

000046

células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (incluyendo cáncer gastrointestinal y cáncer
5 estromal gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de la glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado,
10 cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, melanoma, melanoma de propagación superficial, melanoma maligno lentigo, melanoma lentiginoso acral, melanomas nodulares, así como también linfoma de células B
15 (incluyendo linfoma de bajo grado/ non de Hodgkin folicular (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; NHL de células no escindidas pequeñas de alto grado;
20 NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de células de manto; linfoma relacionado con SIDA; y macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno
25 linfoproliferativo post-transplante (PTLD), así como también la proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como aquel asociado con tumores de cerebro), y síndrome de Meigs.

Los métodos para tratar o prevenir un trastorno
30 inmune también se proporcionan en la presente. Estos métodos

000047

comprenden la administración de una cantidad efectiva del anticuerpo a un sujeto en necesidad de tal tratamiento. En algunas modalidades, el trastorno inmune es un trastorno inmune o un trastorno autoinmune. El trastorno es asma, dermatitis atópica, rinitis alérgica, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, GVHD, y/o lupus eritematoso sistémico. En algunas modalidades, el trastorno es una enfermedad asociada con virus, bacterias u otro agente infeccioso.

Además, los anticuerpos y métodos que se describen en la presente se pueden utilizar para prevenir o tratar afecciones y enfermedades inflamatorias, tales como osteoartritis, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, y enfermedades autoinmunes tal como lupus y enfermedad autoinmune mezclada. Por ejemplo, los anticuerpos descritos en la presente pueden ser útiles en el tratamiento de una variedad de enfermedades autoinmunes e inflamatorias que comprenden la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo a un sujeto en necesidad de la misma, en donde la enfermedad autoinmune o enfermedad inflamatoria es una o más de las siguientes enfermedades: diabetes mellitus insulino-dependiente (IDDM), diabetes mellitus, esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmune experimental, encefalomiелitis diseminada aguda, artritis, artritis reumatoide, artritis autoinmune experimental, miastenia grave, tiroiditis, enfermedad de Hashimoto, mixedema primario, tirotoxicosis, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmune, enfermedad de Addison, menopausia prematura, infertilidad masculina, diabetes juvenil, síndrome de Goodpasture, pénfigo vulgar,

000048

penfigoide, oftalmia simpática, uveítis facogénica, hemolíticanemia autoinmune, leucofenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa Hb_{s-we}, cirrosis criptogénica, colitis ulcerosa, síndrome de Sjogren, escleroderma, granulomatosis de Wegener, poli/dermatomiositis, LE discoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Chron, psoriasis, espondilitis anquilosante, síndrome de anticuerpo antifosfolípido, anemia aplásica, hepatitis autoinmune, enfermedad celiaca, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre (GBS), púrpura trombocitopénica idiopática, síndrome de ppsoclonomioclono (OMS), neuritis óptica, tiroiditis de ORd, pénfigo, poliartritis, cirrosis biliar primaria, síndrome de Reiter, Takayasu, arteritis temporal, anemia hemolítica autoinmune por anticuerpo caliente, granulomatosis de Wegener, alopecia universal, enfermedad de Behcet, enfermedad de Chagas, síndrome de fatiga crónica, disautonomía, endometriosis, hidradenitis supurativa, cistitis intersticial, neuromiotonia, sarcoidosis, escleroderma, colitis ulcerosa, vitíligo, vulvodinia, enfermedades inflamatorias de la piel, dermatitis alérgica por contacto, gastritis *H. pylori*, enfermedad inflamatoria nasal crónica, arterioesclerosis y enfermedad de injerto versus huésped.

Más específicamente, una "enfermedad autoinmune" como es referida en la presente es una enfermedad o trastorno que surge y se dirige contra un tejido u órgano propio del individuo o un co-segregado o manifestación del mismo o afección que resulta de esto. La enfermedad autoinmune puede referirse a una afección que resulta de, o se agrava por, la producción de células B de anticuerpos que son reactivas con

000049

antígenos y tejidos corporales normales. Además, una enfermedad autoinmune es una que puede implicar la secreción de un autoanticuerpo que es específica para un epítipo de un auto-antígeno (por ejemplo, un antígeno nuclear).

5 Las enfermedades autoinmunes o trastornos que son tratables y/o prevenibles por uno o más de los anticuerpos descritos en la presente incluyen, pero no se limitan a, artritis (artritis reumatoide tal como artritis aguda, artritis reumatoide crónica, gota o artritis gotosa, artritis
10 gotosa aguda, artritis inmunológica aguda, artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis inducida por colágeno tipo II, artritis infecciosa, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis psoriásica, enfermedad de Still, artrosis vertebral, y artritis
15 reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis crónica progrediente, artritis deformante, poliartritis crónica primaria, artritis reactiva, y espondilitis anquilosante), enfermedades de la piel hiperproliferativas inflamatorias, psoriasis tal como psoriasis de las placas, psoriasis
20 gutatta, psoriasis pustulosa, y psoriasis de las uñas, atopia, incluyendo enfermedades atópicas tal como fiebre del heno y síndrome de Job, dermatitis incluyendo dermatitis por contacto, dermatitis crónica por contacto, dermatitis exfoliativa, dermatitis alérgica, dermatitis alérgica por
25 contacto, dermatitis herpetiforme, dermatitis numular, dermatitis seborreica, dermatitis no específica, dermatitis por contacto irritante primaria, y dermatitis atópica, síndrome de hiper IgM x-enlazada, enfermedades inflamatorias intraoculares alérgicas, urticaria tal como urticaria crónica
30 alérgica y urticaria idiopática crónica, incluyendo urticaria

000050

crónica autoinmune, miositis, polimiositis, dermatomiositis, dermatomiositis juvenil, necrólisis epidérmica tóxica, escleroderma (incluyendo esclerodermia sistémica), esclerosis tal como esclerosis sistémica, esclerosis múltiple (EM) tal como MS espino-óptica, MS primaria progresiva (PPMS), y MS de remisión recurrente (RRMS), esclerosis sistémica progresiva, ateroesclerosis, arterioesclerosis, esclerosis diseminata, esclerosis atáxica, neuromielitis óptica (NMO), enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) (por ejemplo, enfermedad de Crohn, enfermedades gastrointestinales autoinmuno-mediadas, tal como colitis ulcerativa, colitis ulcerosa, colitis microscópica, colitis colagenosa, colitis poliposa, enterocolitis necrotizante, y colitis transmural, y enfermedad inflamatoria autoinmune del intestino), inflamación del intestino, pioderma gangrenoso, eritema nodoso, colangitis esclerosante primaria, síndrome de dificultad respiratoria, incluyendo síndrome de dificultad respiratoria agudo o en adultos (ARDS), meningitis, inflamación de todo o parte de la úvea, iritis, coroiditis, un desorden hematológico autoinmune, espondilitis reumatoide, sinovitis reumatoide, angioedema hereditario, deño del nervio craneal como en meningitis, herpes gestacional, penfigoide gestacional, prurito de escroto, falla ovárica prematura autoinmune, pérdida de la audición súbita debido a una afección autoinmune, enfermedades mediadas por IgE tal como anafilaxia y rinitis alérgica y atópica, encefalitis tal como encefalitis de Rasmussen y encefalitis límbica y/o del tallo cerebral, uveítis, tal como uveítis anterior, uveítis anterior aguda, uveítis granulomatosa, uveítis no granulomatosa, uveítis facoantigénica, uveítis posterior, o

000051

uveítis autoinmune, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome
nefrótico tal como glomerulonefritis crónica o aguda tal como
GN primaria, GN inmuno-mediada, GN membranosa (nefropatía
membranosa), GN membranosa idiopática o nefropatía membranosa
5 idiopática, GN proliferativa membrano- o membranosa (MPGN),
incluyendo tipo I y tipo II, y GN rápidamente progresiva,
nefritis proliferativa, falla endocrina poliglandular
autoinmune, balanitis incluyendo balanitis plasmacelularis
circumscripta, balanopostitis, eritema anular centrífugo,
10 eritema discrómico perstans, eritema multiforme, granuloma
anular, liquen nitidus, liquen escleroso y atrófico, liquen
simple crónico, liquen espinuloso, liquen plano, ictiosis
laminar, hiperqueratosis epidermolítica, queratosis
premaligna, pioderma gangrenoso, afecciones y respuestas
15 alérgicas, reacción alérgica, eczema incluyendo eczema
alérgico o atópico, eczema asteatótico, eczema dishidrótico,
y eczema vesicular palmoplantar, asma tal como asma
bronquial, asma de bronquios, y asma autoinmune, afecciones
que involucran la infiltración de células T y respuestas
20 inflamatorias crónicas, reacciones inmunes contra antígenos
extraños tales como grupos sanguíneos A-B-O fetales durante
el embarazo, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica,
miocarditis autoinmune, deficiencia de adhesión de
leucocitos, lupus, incluyendo la nefritis de lupus, lupus
25 cerebritis, lupus pediátrico, lupus no renal, lupus extra-
renal, lupus discoide y lupus eritematoso discoide, lupus de
alopecia, lupus eritematoso sistémico (SLE) tal como SLE
cutáneo o SLE cutáneo subagudo, síndrome de lupus neonatal
(NLE), y lupus eritematoso sistémico diseminado, diabetes
30 juvenil (tipo I), diabetes mellitus, incluyendo diabetes

000052

mellitus insulino-dependiente pediátrica (IDDM), diabetes mellitus en adultos (diabetes tipo II), diabetes autoinmune, diabetes idiopática insípida, retinopatía diabética, nefropatía diabética, trastorno diabético de arteria grande, respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis incluyendo granulomatosis linfomatoide, granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculitis, incluyendo vasculitis, vasculitis de vasos grandes (incluyendo arteritis de células gigantes (Takayasu) y polimialgia reumática), vasculitis de vasos medianos (incluyendo enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa/periarteritis nodosa), poliarteritis microscópica, inmunovasculitis, vasculitis del SNC, vasculitis cutánea, vasculitis de hipersensibilidad, vasculitis necrotizante tal como vasculitis necrotizante sistémica, y vasculitis asociada a ANCA, tal como vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (CSS) y vasculitis de vasos pequeños asociada a ANCA, arteritis temporal, anemia aplásica, anemia aplásica autoinmune, anemia positiva de Coombs, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmune incluyendo anemia hemolítica autoinmune (AIHA), anemia perniciosa (anemia perniciosa), enfermedad de Addison, anemia de glóbulos rojos puros o aplasia (PRCA), deficiencia del Factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmune, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapedesis leucocitaria, trastornos inflamatorios del SNC, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, síndrome de lesión de múltiples órganos tales como aquellas secundarias a la septicemia, trauma o hemorragia, enfermedades mediadas por

complejos de antígeno-anticuerpo, enfermedad de membrana basal anti-glomerular, síndrome de anticuerpo anti-fosfolípido, neuritis alérgica, enfermedad/síndrome de Behcet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, 5 síndrome de Reynaud, síndrome de Sjogren, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide tal como penfigoide buloso y penfigoide de piel, pénfigo (incluyendo pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, pénfigo penfigoide de membrana mucosa, y pénfigo eritematoso), poliendocrinopatías autoinmunes, 10 enfermedad o síndrome de Reiter, lesión térmica, preeclampsia, un trastorno de complejo inmune tal como nefritis compleja inmune, nefritis mediada por anticuerpos, polineuropatías, neuropatía crónica tal como polineuropatías de IgM o neuropatía mediada por IgM, trombocitopenia (como se 15 desarrolla por pacientes con infarto al miocardio, por ejemplo), incluyendo púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), púrpura de post-transfusión (PTP), trombocitopenia inducida por heparina, y trombocitopenia autoinmune o inmuno-mediada tal como púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) 20 incluyendo ITP crónica o aguda, escleritis tal como cerato-escleritis idiopática, episcleritis, enfermedad autoinmune de los testículos y ovarios incluyendo orquitis y ooforitis, hipotiroidismo primario, hipoparatiroidismo, enfermedades endocrinas autoinmunes incluyendo tiroiditis tal como 25 tiroiditis autoinmune, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), o tiroiditis subaguda, enfermedad de tiroides autoinmune, hipotiroidismo idiopático, de Grave, síndromes poliglandulares tal como síndromes poliglandulares autoinmunes (o síndromes de endocrinopatía 30 poliglandular), síndromes paraneoplásicos, incluyendo

síndromes paraneoplásicos neurológicos tal como síndrome
miasténico de Lambert-Eaton o síndrome de Eaton-Lambert,
síndrome del hombre rígido o persona rígida, encefalomiелitis
tal como encefalomiелitis alérgica o encefalomiелitis
5 alérgica y encefalomiелitis alérgica experimental (EAE),
miastenia grave tal como miastenia grave asociada con timoma,
degeneración cerebelar, neuromiotonia, síndrome de opsoclono
u opsoclono-mioclono (OMS), y neuropatía sensorial,
neuropatía motora multifocal, síndrome de Sheehan, hepatitis
10 autoinmune, hepatitis crónica, hepatitis lupoides, hepatitis
de células gigantes, hepatitis activa crónica o hepatitis
activa crónica autoinmune, neumonitis intersticial linfocítica
(LIP), bronquiolitis obliterante (sin trasplante) vs NSIP,
síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Berger (nefropatía
15 de IgA), nefropatía de IgA idiopática, dermatosis lineal de
IgA, dermatosis neutrofílica febril aguda, dermatosis
pustular subcorneal, dermatosis acantolítica transitoria,
cirrosis tal como cirrosis biliar primaria y neumonocirrosis,
síndrome de enteropatía autoinmune, enfermedad celíaca o
20 coeliaca, esprúe celíaco (enteropatía por gluten), esprúe
refractario, esprúe idiopático, crioglobulinemia, esclerosis
lateral amiotrófica (ALS; enfermedad de Lou Gehrig),
enfermedad de arteria coronaria, enfermedad autoinmune del
oído tal como enfermedad autoinmune del oído interno (AIED),
25 pérdida de audición autoinmune, policondritis tal como
policondritis refractaria o recidivante o de recaída,
proteinosis alveolar pulmonar, queratitis intersticial no
sifilítica/síndrome de Cogan, parálisis de Bell,
enfermedad/síndrome de Sweet, rosácea autoinmune, dolor
30 asociado con herpes zoster, amiloidosis, una linfocitosis no

cancerosa, una linfocitosis primaria, la cual incluye linfocitosis de células B monoclonales (por ejemplo, gammopatía monoclonal benigna y gammopatía monoclonal de significancia indeterminada, MGUS), neuropatía periférica, 5 síndrome paraneoplásico, canalopatías tal como epilepsia, migraña, arritmia, trastornos musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica, y canalopatías del SNC, autismo, miopatía inflamatoria, glomeruloesclerosis focal o segmentaria o focal segmentaria (FSGS), oftalmopatía 10 endocrina, uveorretinitis, coriorretinitis, trastorno hepatológico autoinmune, fibromialgia, falla endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes tal como enfermedades desmielinizantes autoinmunes y polineuropatía 15 desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Dressler, alopecia greata, alopecia total, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia, y telangiectasia), infertilidad autoinmune masculina y femenina, por ejemplo, debido a anticuerpos anti- 20 espermatozoides, enfermedad del tejido conectivo mezclado, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto recurrente, pulmón del granjero, eritema multiforme, síndrome post-cardiotomía, síndrome de Cushing, pulmón de criadores de aves, angiitis granulomatosa alérgica, angiitis linfocítica 25 benigna, síndrome de Alport, alveolitis tal como alveolitis alérgica y alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, reacción a la transfusión, lepra, malaria, enfermedades parasitarias tales como leishmaniosis, quipanosomiasis, esquistosomiasis, ascariasis, aspergilosis, 30 síndrome de Sampter, síndrome de Caplan, dengue,

endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar
intersticial difusa, fibrosis intersticial pulmonar, fibrosis
pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística,
endoftalmitis, eritema elevatum et diutinum, eritroblastosis
5 fetal, faciitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome
de Felty, flariasis, ciclitis tal como ciclitis crónica,
ciclitis heterocrónica, iridociclitis (aguda o crónica), o
ciclitis de Fuch, púrpura de Henoch-Schonlein, infección por
virus de inmunodeficiencia humana (VIH), SCID, síndrome de
10 inmunodeficiencia adquirida (SIDA), infección por ecovirus,
sepsis, endotoxemia, pancreatitis, tiroxicosis, infección por
parvovirus, infección por virus de la rubéola, síndromes de
post-vacunación, infección por rubéola congénita, infección
por virus de Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan,
15 insuficiencia gonadal autoinmune, corea de Sydenham, nefritis
post-estreptocócica, tromboangitis obliterans, tirotoxicosis,
tabes dorsal, corioiditis, polimialgia de células gigantes,
neumonitis por hipersensibilidad crónica,
queratoconjuntivitis seca, queratoconjuntivitis epidémica,
20 síndrome nefrítico idiopático, nefropatía de cambios mínimos,
lesión por isquemia-reperfusión y benigna familiar,
reperfusión por trasplante de órgano, autoinmunidad retinal,
inflamación articular, bronquitis, enfermedad crónica
obstructiva pulmonar/de las vías respiratorias, silicosis,
25 aftas, estomatitis aftosa, trastornos arterioescleróticos,
aspleniogenese, hemólisis autoinmune, enfermedad de Boeck,
crioglobulinemia, contractura de Dupuytren, endoftalmia
facoanafiláctica, enteritis alérgica, eritema nodoso leproso,
parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica,
30 fiebres reumática, enfermedad de Hamman-Rich, pérdida de la

audición sensoneural, hemoglobinuria paroxismática, hipogonadismo, ileítis regional, leucopenia, mononucleosis infecciosa, mielitis transversal, mixedema idiopático primario, nefrosis, oftalmía simpática, orquitis

5 granulomatosa, pancreatitis, polirradiculitis aguda, pioderma gangrenoso, tireoiditis de Quervain, atrofia espénica adquirida, timoma no maligno, vitíligo, síndrome de choque tóxico, intoxicación alimentaria, afecciones que involucran la infiltración de células T, deficiencia de adhesión de

10 leucocito, respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, enfermedades que implican diapedesis leucocitaria, síndrome de lesión de múltiples órganos, enfermedades mediadas por complejo de antígeno-anticuerpo, enfermedad de membrana basal

15 antiglomerular, neuritis alérgica, poliendocrinopatías autoinmunes, ooforitis, mixedema primario, gastritis atrófica autoinmune, oftalmía simpática, enfermedades reumáticas, enfermedad del tejido conectivo mezclado, síndrome nefrótico, insulitis, insuficiencia poliendocrina, síndrome

20 poliglandular autoinmune tipo I, hipoparatiroidismo idiopático del adulto (AOIH), cardiomiopatía tal como cardiomiopatía dilatada, epidermolisis bulosa adquirida (EBA), hemocromatosis, miocarditis, síndrome nefrótico, colangitis esclerosante primaria, sinusitis purulenta o no

25 purulenta, sinusitis aguda o crónica, sinusitis etmoidal, frontal, maxilar o esfenoidal, un trastorno relacionado con eosinófilos tal como eosinofilia, eosinofilia por infiltración pulmonar, síndrome de eosinofilia-mialgia, síndrome de Loffler, pulmonía eosinófila crónica, eosinofilia

30 pulmonar tropical, aspergilosis bronconeumónica, aspergiloma,

o granulomas que contienen eosinófilos, anafilaxia, espondiloartritis seronegativas, enfermedad autoinmune poliendocrina, colangitis esclerosante, candidiasis mucocutánea esclerótica, episclerótica, crónica, síndrome de
5 Bruton, hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de ataxia telangiectasia, angiectasis, trastornos autoinmunes asociados con enfermedad de colágeno, reumatismo, enfermedad neurológica, linfadenitis, reducción de la respuesta de la
10 presión arterial, disfunción vascular, lesión tisular, isquemia cardiovascular, hiperalgesia, isquemia renal, isquemia cerebral, y vascularización que acompaña a la enfermedad, trastornos de hipersensibilidad alérgica, glomerulonefritis, lesión por reperfusión, trastorno de
15 reperfusión isquémica, lesión por reperfusión del miocardio u otros tejidos, traqueobronquitis linfomatosa, dermatosis inflamatorias, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, insuficiencia de órganos múltiples, enfermedades bulosas, necrosis renal cortical, meningitis purulenta aguda
20 u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, trastornos inflamatorios oculares y orbitales, síndromes asociados con la transfusión de granulocitos, toxicidad inducida por citocinas, narcolepsia, inflamación grave aguda, inflamación crónica intratable, pielitis,
25 hiperplasia endarterial, úlcera péptica, valvulitis, y endometriosis.

Los anticuerpos descritos en la presente pueden tener una variedad de usos académicos, médicos y comerciales. Los anticuerpos pueden ser utilizados en diferentes tipos de
30 pruebas de diagnóstico, por ejemplo, para detectar una amplia

000059

variedad de enfermedades o la presencia de fármacos (productos farmacéuticos), toxinas u otras proteínas incluyendo hormonas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos descritos en la presente pueden ser útiles en las pruebas para la enfermedad, por ejemplo, en suero o sangre de los pacientes. La enfermedad puede incluir enfermedades relacionadas con OX40 o enfermedades o indicaciones no relacionadas con OX40 incluyendo varios cánceres, enfermedad inflamatoria o autoinmune. Los anticuerpos pueden usarse también en la radioimmuno-detección y radioimmuno-terapia del cáncer y algunos nuevos métodos de pruebas pueden utilizar estos anticuerpos descritos para dirigirse sólo a las membranas celulares de tipos celulares específicos, es decir, cáncer.

Los anticuerpos descritos en la presente podrían hacerse parte de un kit o u otro paquete de diagnóstico. Como tal, en la presente se proporciona un kit de diagnóstico, o artículo de manufactura para uso con el método de tratamiento en la presente. El kit de diagnóstico puede comprender uno o más de los siguientes: material de referencia de antagonista/anticuerpo/fármaco; anticuerpo neutralizante de control positivo (preferiblemente de cabra o monomolgus); columna de Proteína A + G (por ejemplo, columna de proteína A/G); reactivo de deslipidación; amortiguadores de purificación de afinidad de inmunoglobulina (por ejemplo, amortiguadores de enlace, elución y neutralización); suero de complemento; diluyente de ensayo para células; literatura o manual de instrucciones; vial de células congeladas (por ejemplo, células WIL2); reactivo de etiquetado de células (tal como CELL TITER GLO.RTM.), etc.. Por vía de ejemplo, el

000060

kit de diagnóstico puede incluir pero no se limita a: (a) reactivo de deslipidación; (b) amortiguadores (por ejemplo, amortiguadores de enlace y elución) para purificación de afinidad de inmunoglobulinas; y (c) manual de instrucciones que da instrucciones al usuario del kit de diagnóstico para usar el kit para pre-tratar una muestra biológica de una enfermedad autoinmune o cáncer objeto antes de conducir un bioensayo basado en células (tal como un ensayo de anticuerpo neutralizante) en la muestra (por ejemplo, para evitar el problema de interferencia de suero). El kit de diagnóstico opcionalmente comprende adicionalmente alguno o más de: material de referencia de fármaco, anticuerpo neutralizante de control positivo, suero de complemento, diluyente de ensayo para células, y reactivo de etiquetado de células, etc.

Los anticuerpos y otros descubrimientos descritos en la presente también proporcionan métodos de selección de alto rendimiento. Más específicamente, y como se entiende por aquellos expertos en el arte, los métodos de alto rendimiento para seleccionar anticuerpos monoclonales antagonistas o agonistas o moléculas pequeñas que enlaza a receptores OX40, y que pueden inhibir la generación y función de células Tr1 o promueven la generación y función de células Tr1, se hacen posible. En tal método, una línea de células T humana (SU-DHL-1) que tiene la capacidad de producir IL-10 se transfectó con el gen de OX40 humano (SUOX40). 100,000 células de SUOX40 se cultivaron ya sea con 100,000 células de fibroblasto de ratón (células L) o 100,000 células de fibroblasto de ratón que expresan el ligando de OX40 humano (células L de ligando de OX40) en placas de 96 cavidades. Después de 48 horas de

000061

cultivo, los sobrenadantes de cultivo se colectaron para la medición de IL-10 por ELISA específico de IL-10. En un experimento representativo, 100,000 células de SUOX40 produjeron hasta 6,000 pg/ml de IL-10 cultivada en la
5 ausencia de ligando de OX40. En la presencia de ligando de OX40, 100,000 células de SUOX40 produjeron menos de 1,000 pg/ml de IL-10. Este método de cultivo se puede utilizar para seleccionar, inter alia, anticuerpos monoclonales antagonistas o moléculas pequeñas que bloquean la capacidad
10 de ligando de OX40 para inhibir la producción de IL-10 por células de SUOX40. Alternativamente, este método de cultivo se puede modificar reemplazando las células L que expresan el ligando de OX40 con anticuerpos monoclonales agonistas potenciales o moléculas pequeñas específicas para OX40 para
15 determinar, inter alia, su capacidad de inhibir la producción de IL-10 por células de SUOX40.

Los anticuerpos anti-OX40 descritos en la presente se pueden usar como un ensayo o en un ensayo para probar o medir la actividad de un fármaco u otra molécula encontrada
20 en un organismo o muestra orgánica. También se podrían usar en un ensayo cuantitativo para medir la cantidad de una sustancia en una muestra. Los bioensayos e inmunoensayos están entre las muchas variedades de ensayos bioquímicos especializados por los cuales estos anticuerpos se pueden
25 usar. Los anticuerpos anti-OX40 enseñados en la presente se pueden usar en otros ensayos para medir los procesos tal como actividad enzimática, captura de antígeno, actividad de células madre, y enlace de proteína competitivo.

Las células L que expresan GITRL, OX40L, 4-1BBL,
30 ICOSL humanos se generaron por transducción mediada por

000062

retrovirus, como se entiende por aquellos de experiencia en el arte. Brevemente, la secuencia codificante de longitud completa para GITRL (Acceso # NM_005092), OX40L (Acceso # NM_003326), 4-1BBL (Acceso # NM_003811), ICOSL (Acceso # NM_015259) humanos se amplificó por RT-PCR con ARN preparado de PBMCs estimuladas por HSV-1. Subsecuentemente, los ADNc se clonaron en un vector retroviral basado en MSCV pMIGW2 y los plásmidos resultantes se verificaron por digestión de enzima de restricción y secuenciación de ADN. Para producir el retrovirus recombinante, cada vector fue co-transfectado con constructos de empaquetado pCL-gp (gag/pol) y pHCMV-VSVg (envoltura de glicoproteína VSV) en células HEK293T. Dos días más tarde, los sobrenadantes de cultivo que contienen virus se recolectaron y se utilizaron para infectar las células L CD32 a 100. Bajo esta condición > 95% de células fueron transducidas productivamente.

Los monocitos de CD14⁺ aislados (pureza > 94%) se cultivaron en la presencia de 100 ng/ml de GM-CSF y 50 ng/ml de IL-4 (ambos de R&D) durante 5 días, como se entiende por aquellos de experiencia en el arte. Las DCs inmaduras resultantes se lavaron y cultivaron durante 24 h con IFN- α (1000 U/ml, PBL Biomedical Laboratories), IL-10 (10 ng/ml, R&D), y se irradiaron las células L transfectadas con CD40L (relación de DC a células L, 4:1) para obtener DCs maduras, como se entiende por aquellos de experiencia en el arte.

Las células T CD4⁺ naïve y células T CD4⁺ de memoria (cada pureza > 99%) se aislaron de PBMCs usando kit de aislamiento II de células T CD4⁺ (Miltenyi Biotec) seguido por clasificación celular (fracción de CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻CD25⁻ como células T naïve y fracción de CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺CD25⁻

000063

como células T de memoria), como se entiende por aquellos de experiencia en el arte. 4×10^4 células T $CD4^+$ naïve alogénicas recientemente purificadas se co-cultivaron con DCs inmaduras o cultivadas (relación de DC a T, 1:10) en la presencia o ausencia de OX40L humano recombinante (R&D, 100 ng/ml) en placas de cultivo de 96 cavidades de fondo redondo durante 7 días, como se entiende por aquellos de experiencia en el arte. Las células T $CD4^+$ purificadas también se cultivaron con IL-12 (10 ng/ml, R&D), IL-4 (25 ng/ml, R&D), o combinación de dexametasona (5×10^{-8} M, Life Technologies) y 1alfa,25-dihidroxitamina D3 (10^{-7} M) durante 7 días en la presencia de anticuerpo monoclonal anti-CD28 soluble (CD28.2, 1 µg/ml) e IL-2 (50 U/ml, R&D) en las células CD32/OX40L-L irradiadas, células CD32/GITRL-L, células CD32/4-1BBL-L, o células CD32-L parentales las cuales se han pre-recubierto con anticuerpo monoclonal anti-CD3 (OKT3, 0.2 µg/ml) en placas de cultivo de 48 cavidades (relación de células T a células L, 2.5:1), como se entiende por aquellos de experiencia en el arte. En algunos experimentos, las células T $CD4^+$ se cultivaron durante 7 días en las células CD32-L, mezcla de células CD32-L y células CD32/ICOSL-L (relación 1:1), o mezcla de células CD32/ICOSL-L y células CD32/OX40L-L (relación 1:1) pre-recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-CD3 (0.2 µg/ml) en placas de cultivo de 48 cavidades, como se entiende por aquellos de experiencia en el arte. Se utilizó RPMI 1640 y se suplementó con 10% FCS, 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sodio, penicilina G, y estreptomicina para los cultivos, como se entiende por aquellos de experiencia en el arte.

Las células T cultivadas se colectaron y se

000064

lavaron, y luego se reestimularon con anti-CD3 de unión a la placa (5 µg/ml) y anti-CD28 soluble (2 µg/ml) a una concentración de 1×10^6 células/ml durante 24 horas, como se entiende por aquellos de experiencia en el arte. Los niveles de IL-4, IL-10, TNF- α , e IFN- α en los sobrenadantes se midieron por ELISA (todos los kits de R&D), como se entiende por aquellos de experiencia en el arte. Para la producción de citocina intracelular, las células T cultivadas se reestimularon con 50 ng/ml de PMA más 2 µg/ml de yonomicina durante 6 h. La brefeldin A (10 µg/ml) se agregó durante las última 2 h, como se entiende por aquellos de experiencia en el arte. Las células se tiñeron con una combinación de anticuerpos monoclonales etiquetados con PE a anticuerpos monoclonales etiquetados con FITC de IL-4 o TNF- α a anti-IL-10 etiquetado con APC e IFN- α (todos de BD) usando el kit FIX y PERM (CALTAG), como se entiende por aquellos de experiencia en el arte.

Las células T se recolectaron y resuspendieron en un medio que contiene EDTA para disociar los agrupamientos, como se entiende por aquellos de experiencia en el arte. Las células viables se contaron por exclusión de azul de tripano de las células muertas, como se entiende por aquellos de experiencia en el arte. Para el ensayo de función supresora, las células T CD4⁺ naïve (A) y células Tr1 generadas de células T CD4⁺ naïve por anticuerpo monoclonal anti-CD3, anticuerpo monoclonal anti-CD28, IL-2, Dex, y vit D3 en la presencia de las células L parentales (B) o células OX40L-L (C), estos tres tipos de células y sus mezclas a una relación 1:1 luego se reestimularon durante 5 días por cultivo en la presencia de 5 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-CD3 y 1

000065

µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-CD28, después de este tiempo la proliferación celular se evaluó por incorporación de [^3H], como se entiende por aquellos de experiencia en el arte.

5 Generación de anticuerpos monoclonales específicos de OX40 anti-humano

Se generaron múltiples anticuerpos monoclonales de ratón agonistas contra OX40 humano. La especificidad de enlace de antígeno de los anticuerpos se confirmó por
10 citometría de flujo (FIGS. 10-12). La actividad agonista de los anticuerpos se validó a través de ensayos funcionales. Se encontró que nueve de los 20 anticuerpos específicos de OX40 podrían bloquear la generación mediada por vitamina D3/dexametasona de células Tr1 a partir de células T CD4⁺
15 (FIG. 13), mejorar la proliferación de células T CD4⁺ (FIG. 14), y suprimir la producción de IL-10 de Treg ICOS⁺CD4⁺CD25^{alta}FOXP3⁺ (FIG. 16). Se titularon los anticuerpos y se encontró que cinco poseen actividad en la supresión de la generación de células Tr1 a concentraciones tan bajas como
20 4 ng/ml (FIG. 15).

Los anticuerpos OX40 inhiben la función de Treg CD4⁺CD25^{alta}FOXP3⁺

Algunos de los anticuerpos monoclonales de OX40
25 inhiben la función supresora de Treg FOXP3⁺ (FIG. 17). De los cinco anticuerpos (119-8B, 119-43, 119-122, 119-173B, y 106-222) que potentemente inhiben la producción de IL-10 de células Tr1 y Tregs CD4⁺CD25^{alta}CD127⁺FOXP3⁺, tres (119-43, 119-122, y 106-222) fueron potentes en el bloqueo de la
30 función de Treg CD4⁺CD25^{alta}CD127⁺FOXP3⁺ (FIG. 17).

Sin
000066

embargo, dos (119-33 y 120-140A) de los 11 anticuerpos que no tienen actividad contra la producción de IL-10, bloquean la función de Treg $CD4^+CD25^{alta}FOXP3^+$ (Fig.18).

5 Anticuerpos monoclonales OX40 anti-humanos

La generación de anticuerpos monoclonales OX40 anti-humanos se realizó por ejemplo, inmunizando ratones BALB/c de 6-8 semanas de edad con una línea celular de ratón transfectada con OX40 humano siguiendo los protocolos establecidos. Los clones de hibridoma que segregan el anticuerpo monoclonal de hibridoma que específicamente manchó células $OX40^+$ se establecieron y se analizaron adicionalmente.

Se diseñó una selección exhaustiva para detectar aquellos clons que activan la señalización de OX40 (es decir, anticuerpos agonistas) inhibiendo la generación y función de células Tr1. Aquellos clones se purificaron adicionalmente. Los anticuerpos agonistas contra hOX40 se pueden humanizar y usar en protocolos clínicos para terapia anti-tumor humana, ya sea solos o en combinación con vacunación anti-tumor y otros adyuvantes. Diversos tipos de tumor diferentes podrían ser el objetivo de estos anticuerpos, incluyendo melanoma, linfoma y cáncer de mama.

En otra modalidad, se utilizaron ratones hembra BALB/c de 6-8 semanas de edad para inmunización subcutánea o en almohadilla plantar. Cada ratón se inyectó con 5 millones de células L murinas transfectadas con OX40 humano (L-OX40) 6 veces a intervalos de 3 días. Tres días después de la sexta inyección, los ratones se sacrificaron y los nódulos linfáticos popliteales (de la inmunización en almohadilla

000067

plantar) o bazo (de la inmunización subcutánea) se removieron y las células se fusionaron con células de mieloma SP2.0 o mieloma NSO a una relación de 1 a 1 para generar clones de hibridoma usando protocolos establecidos. Los clones de hibridoma que segregan anticuerpo monoclonal luego se seleccionaron para su especificidad de enlace a células L-hOX40 por ensayos de ELISA. Los sobrenadantes de hibridoma que enlazan a células L-hOX40 y no células L parentales se confirmaron adicionalmente para enlace en células L-hOX40 y SUPM2-hOX40 por análisis de citometría de flujo.

En el experimento de la FIG. 10, los sobrenadantes de hibridoma de hOX40 se seleccionaron contra células L-hOX40 versus células parentales L por ELISA. Veinte anticuerpos monoclonales específicos de hOX40 se seleccionaron. Veinte millones de células L o células L que expresan OX40 humano (L-hOX40) se recubrieron en una placa de 96 cavidades mezclando las células con 0.01% cloruro de magnesio y calcio en PBS y se dejaron secar durante la noche en una campana laminar. Las placas luego se congelaron a -20°C por al menos un día antes del uso. Para ensayos de enlace de anticuerpo, las células congeladas se rehidrataron con PBS y se lavaron con amortiguador de lavado que contiene PBS más 0.05% Twen 20, y se bloquearon con 2% BSA en amortiguador de lavado. Las células acondicionadas luego se usaron para enlace a sobrenadantes de anticuerpo OX40. El enlace de anticuerpo a células luego se detectó con un anticuerpo secundario, FC HRP de IgG anti-ratón. Los sobrenadantes de hibridoma específico de hOX40 reconocen las células L que expresan OX40 pero no células L parentales.

En el experimento de la FIG. 11, los anticuerpos

000068

monoclonales específicos de hOX40 se seleccionaron por análisis de citometría de flujo. Números iguales (100k) de células L y L-hOX40 se mezclaron en amortiguador de FACS (1% FCS/2mM EDTA/PBS) y se incubaron con 0.5 µg de anticuerpos purificados FPLC (Proteína A HiTrap/Amortiguador de elución de Ag/Ab Ligerio). Las células luego se lavaron y tiñeron con un anticuerpo secundario, IgG anti-ratón conjugado con PE. Dos picos indican tinción positiva y negativa por anticuerpo monoclonal anti-hOX40. Un pico único sugiere no enlace o ningún enlace específico de anticuerpos. Veinte anticuerpos monoclonales específicos de hOX40 se confirmaron por análisis de citometría de flujo.

En el experimento de la FIG. 12, la especificidad de anticuerpos monoclonales hOX40 se confirmó usando células SUPM2 que expresan hOX40 (SUPM2-hOX40). Números iguales (100k) de células SUPM2 y SUPM2-hOX40 se mezclaron en amortiguador de FACS (1% FACS/2mM EDTA/PBS) y se utilizaron para enlace de anticuerpo monoclonal hOX40 como en la FIG. 11. La especificidad de enlace de cada anticuerpo se analizó por citometría de flujo. Dos picos indican tinción positiva y negativa por anticuerpo monoclonal anti-hOX40, mientras que un pico único sugiere no enlace o ningún enlace específico por anticuerpos. Veinte anticuerpos monoclonales específicos de hOX40 se confirmaron.

En el experimento de la FIG. 13, se buscó identificar anticuerpos monoclonales específicos de OX40 humano que pueden inhibir la generación de células Tr1 a partir de células T CD4⁺ estimulada por VitD₃ (10 micromoles mM)/Dex (50 nanoM), CD32L/ICOSL y anti-CD3/CD28 (0.2 microgramos/ml). Los anticuerpos monoclonales anti-hOX40 se

agregaron en el día 0 del cultivo celular y las células T CD4⁺ después de 7 días de estimulación se sometieron a tinción intracelular de IL-10 seguida por análisis de citometría de flujo. Los datos representativos de

5 Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia (FACS) se muestran en A y los porcentajes de las células Tr1 para todos los tratamientos de anticuerpos monoclonales anti-hOX40 se muestran en B. Usando las células obtenidas de este experimento, se buscó identificar los anticuerpos

10 monoclonales específicos de hOX40 que estimulan la proliferación de células T CD4⁺ (FIG. 14, las células se contaron en el día 7 después de la estimulación) e inhibir la generación de Tr1 a partir de CD4⁺ (FIG. 13).

Para identificar tales anticuerpos monoclonales

15 hOX40 para su capacidad de inhibir la generación de células Tr1 a partir de células T CD4⁺, las células Tr1 se generaron y cultivaron como se describe en los experimentos para la FIG. 13 anterior. Los datos representativos de FACS se muestran en A y el porcentaje de células Tr1 después del

20 tratamiento con nueve anticuerpos monoclonales anti-hOX40 se muestra en B. Cinco anticuerpos monoclonales específicos de hOX40 inhibieron fuertemente la generación de células Tr1 a concentración de 4 ng/ml (FIG. 15).

En el experimento de las FIGS. 16A, 16B, y 16C, las

25 células T ICOS⁺CD4⁺CD127⁻CD25^{alta} recientemente clasificadas se estimularon con anti-CD3 (0.2 µg/ml) en la presencia de células CD32L/ICOSL y células CD32/hOX40L o anticuerpos monoclonales anti-hOX40 o anticuerpo de control durante 5 días. Luego, las células se contaron y 5x10⁴ células se

30 reestimularon con anti-CD3/CD28 durante 4 horas y los

000070

sobrenadantes se sometieron a ensayo para secreción de IL-10 con un kit de Elisa. Se identificaron los anticuerpos monoclonales específicos de hOX40 que inhiben la generación de Tr1 a partir de células T $CD4^+$ que también inhiben la producción de IL-10 naturalmente de células T $ICOS^+CD4^+CD25^{alta}$. Las Tregs $ICOS^+ICOS^-CD4^+CD127^-CD25^{alta}$ se cultivaron con células $CD4^+CD25^{baja}$ etiquetadas con CFSE en la presencia de monocitos irradiados y anti-CD3 (0.3 μ g/ml) y mAbs anti-hOX40. Después de 3.5 días de cultivo, la proliferación celular se evaluó para dilución de CFSE en células por FACS (FIG. 16C).

Las FIGS. 17A y 17B muestran la identificación de anticuerpos monoclonales anti-hOX40 que inhiben la generación de células Tr1 y bloquean la función de Treg $FOXP3^+CD4^+CD25^{alta}$. Las células T $FOXP3^+CD4^+CD127^-CD25^{alta}$ recientemente clasificadas (3.5×10^4) se cultivaron con células $CD4^+CD25^{baja}$ etiquetadas con CFSE (7×10^4) en la presencia de monocitos irradiados (7×10^4 , 6000 rad) y 0.3 μ g/ml de anti-CD3 y varias concentraciones de anticuerpo monoclonal anti-hOX40. Después de 3 a 4 días de cultivo, se evaluó la proliferación celular para la dilución de CFSE en células por análisis de citometría de flujo. El porcentaje de células divididas se indicó. Los análisis de citometría de flujo representativos se muestran en la FIG. 17A. Los datos para 6 anticuerpos monoclonales se muestran en la FIG. 17B.

En el experimento de la FIG. 18, las células T $FOXP3^+CD4^+CD127^-CD25^{alta}$ recientemente clasificadas (3.5×10^4) se cultivaron con células $CD4^+CD25^{baja}$ etiquetadas con CFSE (7×10^4) en la presencia de monocitos irradiados (7×10^4 , 6000 rad) y 0.3 μ g/ml de anti-CD3 y varias concentraciones de anticuerpo monoclonal OX40. Después de 3 a 4 días de cultivo,

006071

la proliferación celular se evaluó para la dilución de tinte de CFSE en las células por FACS. Los datos son representativos de dos experimentos. Se identificaron los anticuerpos monoclonales anti-hOX40 que no inhiben la
5 generación de Tr1 pero bloquean la función de Treg FOXP3⁺CD4⁺CD25^{alta}.

En el experimento de las FIGS. 19A y 19B, las células T CD4⁺CD25^{alta} derivadas de linfoma se cultivaron con células CD4⁺CD25^{baja} etiquetadas con CFSE (7×10^4) aisladas de
10 un donante sano en la presencia de monocitos alogénicos irradiados (7×10^4 , 6000 rad) y 0.3 microgramos/ml de anti-CD3 y 25 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-hOX40. Después de 3 a 4 días de cultivo, la proliferación celular se evaluó para la dilución de CFSE por FACS. Los análisis
15 representativos de FACS se muestran en la FIG. 19A y los datos para todos los experimentos se muestran en la FIG. 19B. Se descubrió que los anticuerpos agonistas hOX40 bloquean la función de Treg CD4⁺CD25^{alta} derivadas de linfoma.

La FIG. 20 muestra la identificación de anticuerpos
20 agonistas OX40 que enlazan específicamente a OX40 de mono rhesus y humano. Las células mononucleares de sangre periférica de mono rhesus se obtuvieron por centrifugación de ficoll. Las células T CD4⁺ se obtuvieron por microperlas de CD4. Las células T CD4⁺ se estimularon con 10 µg/ml de
25 lectina de phaseolus vulgaris (PHA). Dos días después de la estimulación, las células se tiñeron con mAbs anti-hOX40 seguido por IgG-APC anti-ratón de cabra y CD69-PE. 106-317 sirvió como un control negativo. Se muestran seis mAbs anti-hOX40 que activan fuertemente la proliferación de células T
30 podrían enlazar las células T CD4⁺ de mono rhesus activadas.

000072

Estos resultados indican que la toxicidad de estos seis anticuerpos monoclonales anti-hOX40 se pueden probar en monos.

Solamente siete de 500 clones positivos a OX40 anti-humano obtenidos usando los protocolos de fusión convencionales, exhibieron las propiedades de activación de OX40, incluyendo pero no limitado a, la capacidad de bloquear la generación de Tr1 que producen IL-10 y función supresora de nTreg como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista de anticuerpos monoclonales específicos de OX40

	Clon de anticuerpo monoclonal	Bloquean IL-10	Bloquean nTreg
1	106-108	-	-
2	106-317	-	-
3	106-107	-	-
4	106-148	-	-
5	119-204A	-	-
6	119-220C	-	+
7	119-33A	-	+
8	119-58	-	+
9	119-181A	-	+
10	119-157A	-	+

11	120-140A	-	+
12	119-8B	+	-
13	119-173B	+	-
14	106-132	+	+
15	106-222	+	+
16	119-43	+	+
17	119-122	+	+
18	119-69A	+	+
19	120-56	+	+
20	120-270	+	+

000073

Los clones de hibridoma 106-222 y 119-122 se seleccionaron con base en tres criterios

1. Inhiben la generación de células Tr1 de células T CD4⁺ (Treg inducibles)
2. Invierten la función supresora de las células nTreg FOXP3⁺
3. Exhiben inhibición dependiente de la dosis de cierre de células Tr1 e inversión de la función de Treg FOXP3⁺

10

Anticuerpos Quiméricos y Humanizados

La humanización (también llamada reorganización o inserción de CDR) es una técnica establecida para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos monoclonales de fuentes xenogeneicas (incluyendo pero no limitado a roedores) y para mejorar su activación del sistema inmune humano. Aunque se conocen los mecanismos de producción de anticuerpo monoclonal modificado genéticamente usando las técnicas de biología molecular, la inserción simple de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) en armazones humanos no siempre reconstituye la afinidad de enlace y la especificidad del anticuerpo monoclonal original.

Para humanizar un anticuerpo, el diseño del anticuerpo humanizado llega a ser la etapa crítica en la reproducción de la función de la molécula original. Este diseño incluye varias opciones: las extensiones de las CDR, los armazones humanos a usar y la sustitución de los residuos del anticuerpo monoclonal de roedor en las regiones de armazón humano (retromutaciones). Las posiciones de estas retromutaciones se han identificado principalmente por

000074

análisis de secuencia/estructural o por análisis de un modelo de homología de la estructura 3D de la región variable.

Recientemente, se han utilizado genotecas de fago para variar los aminoácidos en las posiciones elegidas. De manera similar, muchos procedimientos se han utilizado para 5 elegir los armazones humanos más adecuados en los cuales injertar las CDRs de roedor. Los experimentos tempranos utilizaron un subconjunto limitado de anticuerpos monoclonales humanos bien caracterizados (frecuentemente pero 10 no siempre donde la estructura estuvo disponible), sin considerar la identidad de secuencia con el anticuerpo monoclonal de roedor (el procedimiento de armazones fijos así llamado). Algunos grupos usan regiones variables con alta identidad de secuencia de aminoácido con las regiones 15 variables de roedor (mejor ajuste o igualación de homología); otros usan secuencias de consenso o línea germinal mientras que aún otros seleccionan fragmentos de las secuencias de armazón dentro de cada región variable de cadena ligera o pesada de diversos anticuerpos monoclonales humanos 20 diferentes. También hay procedimientos para la humanización desarrollada la cual reemplaza los residuos de roedor de superficie con los residuos más comunes encontrados en anticuerpos monoclonales humanos ("recapado" o "chapado") y aquellos los cuales usan diferentes definiciones de las 25 extensiones de las CDRs. Los anticuerpos humanizados se describen a continuación. Sin embargo, un anticuerpo quimérico que comprende las regiones variables pesada y ligera de las SEC ID NOs: 4 y 10, o, SEC ID NOs: 16 y 22 también se describen en la presente.

Los anticuerpos monoclonales humanizado se derivaron del anticuerpo anti-OX40 murino.

El anticuerpo anti-OX40 humanizado aislado puede tener una cadena pesada variable CDR1 que comprende la
5 secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1 o 13. El anticuerpo anti-OX40 humanizado aislado puede tener una cadena pesada variable CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2 o 14. El anticuerpo anti-OX40 humanizado aislado puede tener una cadena pesada variable CDR3 que comprende la
10 secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 3 o 15.

El anticuerpo anti-OX40 humanizado aislado puede tener una cadena ligera variable CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7 o 19. El anticuerpo anti-OX40 humanizado aislado puede tener una cadena ligera
15 variable CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 8 o 20. El anticuerpo anti-OX40 humanizado aislado puede tener una cadena ligera variable CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9 o 21.

El anticuerpo anti-OX40 humanizado aislado puede
20 tener una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 11 o 23, o una secuencia de aminoácidos con al menos 90 por ciento de identidad con las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 11 o 23. El anticuerpo anti-OX40 humanizado aislado puede tener una
25 cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO.: 5 o 17, o una secuencia de aminoácidos con al menos 90 por ciento de identidad con las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 5 o 17.

El anticuerpo anti-OX40 humanizado aislado puede
30 tener una cadena ligera variable codificada por la secuencia

000076

de ácido nucleico de SEC ID NO: 12 o 24, o una secuencia de ácido nucleico con al menos 90 por ciento de identidad con las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 12 o 24. El anticuerpo anti-OX40 humanizado aislado puede tener una
5 cadena pesada variable codificada por una secuencia de ácido nucleico de SEC ID NO: 6 o 18, o una secuencia de ácido nucleico con al menos 90 por ciento de identidad con las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 6 o 18.

10 Expresión de anticuerpos anti-OX40 humanizados

Un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención se puede preparar por expresión recombinante de genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina en una célula huésped. Para expresar un anticuerpo de manera
15 recombinante, una célula huésped se transfectó con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina del anticuerpo de modo que las cadenas ligera y pesada se expresan en la célula huésped y, preferiblemente,
20 se segregan en el medio en el cual las células huéspedes se cultivaron, del medio los anticuerpos se pueden recuperar. Las metodologías de ADN recombinante estándares se usan para obtener los genes de cadena pesada y ligera de anticuerpo, incorporar estos genes en los vectores de expresión
25 recombinantes e introducir los vectores en células huéspedes, tales como aquellas descritas en Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F. M. et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology,
30 Greene Publishing Associates, (1989) y en la Patente de

. 000077

Estados Unidos No. 4,816,397 de Boss et al.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo y variantes se pueden producir a partir de una variedad de células animales, preferiblemente de células de mamífero, con células murinas y humanas siendo particularmente preferidas. Además, los sistemas de expresión de ADN recombinante podrían incluir aquellos que utilizan células huéspedes y constructos de expresión que se han modificado genéticamente para producir altos niveles de una proteína particular. Tales células huéspedes y constructos de expresión pueden incluir *Escherichia coli*; constructos de expresión de albergue derivados de plásmidos o virus (bacteriófago); levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* que albergan constructos de expresión episomal o cromosomalmente integrados; células de insectos y virus tal como células Sf9 y baculovirus; y células de mamífero que albergan constructos de expresión episomal o cromosomalmente integrados (que incluyen pero no se limitan a, retrovirales) (tales métodos, por ejemplo, se pueden ver del manuscrito Verma et al., *J. Immunol. Methods* 216:165-181, 1998). Los anticuerpos también se pueden producir en plantas (tales métodos, por ejemplo, se pueden ver de la Patente de Estados Unidos No. 6,046,037; Ma et al., *Science* 268:716-719, 1995) o por tecnología de expresión en fagos (tales métodos, por ejemplo, se pueden ver de Winter et al., *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455, 1994).

Los anticuerpos anti-OX40 humanos que exhiben un nivel de actividad y especificidad/afinidad de enlace que son deseables se pueden manipular adicionalmente por técnicas de ADN recombinante estándares, por ejemplo para convertir los genes de región variable a gen de cadena de anticuerpo de

000078

longitud completa, a genes de fragmento Fab o a un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH se enlaza operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazante flexible. El término "operativamente enlazado", como se utiliza en este contexto, se entiende que significa que los dos fragmentos de ADN se unen de modo que las secuencias de aminoácido codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en armazón.

En otro aspecto, el ADN aislado que codifica la región VH se puede convertir a un gen de cadena pesada de longitud completa enlazando operativamente el ADN codificante de VH a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2, y CH3). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humanos se conocen en el arte (ver, por ejemplo, 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) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener por amplificación de PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG-1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD y cualquier variante alotípica en la presente como se describe en Kabat (, 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), pero muy preferiblemente es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN codificante de VH se puede enlazar operativamente a otra molécula de ADN que codifica solamente la región

000079

constante de cadena pesada CH1.

Además, un anticuerpo humanizado unido al antígeno de superficie puede interactuar con células que portan FcR. Tal interacción puede producir función efectora tal como ADCC y/o mejorar la señalización debido a la reticulación mediada por Fc. La interacción puede ser benéfica o dañina para la terapia. Tales efectos secundarios dañinos incluyen escalofríos, fiebre, hipotensión, y en algunos casos, disnea (Thistlethwaite JR Jr., Cosimi AB, Delmonico FL, et al.).

Ciertos efectos dañinos pueden originarse en el complejo de proteína encontrado en la superficie de una célula T. En la activación de las células T, el complejo de proteína llega a estar involucrado en la transducción de señales generadas vía un receptor de antígeno. En breve, la activación de las células T inicia una cascada de eventos los cuales incluyen la reticulación mejorada del receptor de antígeno. La reticulación del receptor puede contribuir a fuerte señalización mitogénica que conduce a la inducción de ciertas citocinas tal como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- γ). Estas citocinas se sabe que son tóxicas si se generan en grandes cantidades.

Por ejemplo, los mAbs anti-CD3 se utilizan actualmente en el tratamiento de enfermedad autoinmune incluyendo diabetes mellitus tipo I en la cual las células T median el ataque contra islotes pancreáticos, productores de insulina (Kaufman A, and Herold K. Anti-CD3 mAbs for treatment of type 1 diabetes *Diabetes Metab Res Rev* 2009; 25: 302-306). Los anticuerpos anti-CD3 se sabe que inhiben la lisis de objetivos por células T y mejoran la reticulación de la CDR

000080

receptora de antígeno. Además, junto con su potente actividad mitogénica, el anticuerpo anti-CD3 se sabe que es un potente inductor de citocinas, específicamente, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- γ). La enorme liberación de citocinas, particularmente TNF- α de células T en respuesta al fármaco (Chatenoud L.) produce efectos tóxicos. Estos efectos secundarios indeseables se han atribuido a la reticulación de células T que portan moléculas de CD3 y las células que portan FcR que enlazan la porción Fc de los anticuerpos. La reticulación activa tanto las células T como las células que portan FcR conduciendo a la liberación masiva de citocinas como se mencionó previamente.

De manera similar, los efectos secundarios potenciales indeseables podrían resultar usando anticuerpos anti-OX40. Por ejemplo, los anticuerpos anti-OX40 los cuales enlazan células que expresan OX40 también pueden enlazar células que portan FcR y activar la producción de citocinas que pueden ser benéficas o dañinas para los pacientes tratados con el anticuerpo. Para superar este problema potencial, se han diseñado y presentado en la presente métodos para la mutación de la porción FcR de los anticuerpos anti-OX40 para evitar los efectos tóxicos y proporcionar mutaciones a la porción FcR lo cual puede ser deseable.

Se conoce el sitio de IgG1 humana que interactúa con FcR (CD16, CD32 y CD64). Mapea el dominio CH2 superior. Los aminoácidos más importantes son los dos residuos Leu en las posiciones 234 y 235. Mutando estos dos residuos a dos residuos Ala, son abolidas las interacciones de IgG1 a todas las FcRs. El anti-CD3 humanizado incorpora estas mutaciones

(KuOKT3AA), es un fármaco mucho más seguro y tiene un mecanismo de acción que es diferente de aquel de HuOKT3. Ver por ejemplo, Patente de Estados de Unidos No. 6,491,916, incorporada para referencia en su totalidad.

5 Las posiciones del mutante AA se muestran como sigue:

---A---P---E---L---L---G---G---P--- CH2 superior de IgG1 tipo silvestre

---A---P---E---A---A---G---G---P--- CH2 superior de IGG1 de

10 Mutante AA

Hu222AA y Hu122AA descritos en la presente pueden contener estas mutaciones. Si el sistema de ensayo contiene células que portan FcR, se puede ver la diferencia entre la tipo silvestre y el mutante AA. De otra manera, los dos anticuerpos deben comportarse igual.

El ADN aislado que codifica la región de VL se puede convertir a un gen de cadena ligera de longitud completa (así como también un gen de cadena ligera de Fab) enlazando operativamente el ADN codificante de VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera humanos se conocen en el arte (ver por ejemplo, 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) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener por amplificación de PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

30 Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN

000082

que codifican VH y VL se enlazan operativamente a otro fragmento que codifica un enlazante flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly.sub.4-Ser).sub.3, de modo que las secuencias de VH y VL se pueden
5 expresar como una proteína de cadena única contigua, con las regiones de VL y VH unidas por el enlazante 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., Nature (1990) 348:552-554.

10 Se contemplan las modificaciones de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en la presente. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de enlace y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácido del anticuerpo se preparan
15 introduciendo cambios de nucleótido apropiados en el ácido nucleico de anticuerpo, o por síntesis de péptido. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier
20 combinación de supresión, inserción, y sustitución se hace para llegar al constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácido se pueden introducir en la secuencia de aminoácidos de anticuerpo objeto en el momento que se hace la
25 secuencia.

Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis es llamado "mutagénesis de barrido de alanina" como se describe por Cunningham and Wells
30 (1989) Science, 244:1081-1085. Aquí, se identifica un residuo

000083

o grupo de residuos objetivo (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se reemplaza por un aminoácido neutral o negativamente cargado (muy preferiblemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con antígeno. Aquellas ubicaciones de aminoácido que demuestran la sensibilidad funcional a las sustituciones luego se refinan introduciendo variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Por consiguiente, mientras que el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácido se predetermina, la naturaleza de la mutación per se no necesita ser predeterminada. Por ejemplo, para analizar el funcionamiento de una mutación en un sitio dado, la mutagénesis aleatoria o de barrido ala se conduce en la región o codón objetivo y las inmunoglobulinas expresadas se seleccionan para la actividad deseada.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones de amino- y/o carboxilo-terminal que varían de longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cientos o más residuos, así como también inserciones de intersecuencia de residuos de aminoácido únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al N- o C-término del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido el cual incrementa la vida media en suero del anticuerpo. Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Tal alteración incluye la supresión de una o más

000084

porciones de carbohidrato encontradas en el anticuerpo, y/o adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un residuo aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero las alteraciones de FR también se contemplan. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 de la Patente de Estados Unidos No. 7,812,133, Col. 43, ls. 55 a Col. 44, l. 49, incorporada en la presente para referencia, y bajo el encabezado de "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones resultan en un cambio de la actividad biológica, entonces los cambios más sustanciales, denominadas "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente a continuación con referencia a las clases de aminoácido, se pueden introducir y los productos se seleccionan.

Además, las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se realizan seleccionando las sustituciones que difieren significativamente de su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación helicoidal u hoja, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos que se presentan naturalmente se dividen en grupos basados en propiedades de cadena lateral comunes: (1) hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile; (2)

000085

hidrofílicos neutrales: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) ácidos: asp, glu; (4) básicos: his, lys, arg; (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y (6) aromáticos: trp, tyr, phe. Las sustituciones no conservadoras
5 ocasionarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Para expresar los anticuerpos, o porciones de anticuerpo descritas en la presente, los ADNs que codifican cadenas ligera y pesada de longitud completa o parcial,
10 obtenidos como se describe anteriormente, se insertan en vectores de expresión de modo que los genes son operativamente enlazados a secuencias de control transcripcionales o traduccionales. En este contexto, el término "operativamente enlazado" se propone que signifique
15 que un gen de anticuerpo es ligado en un vector de modo que las secuencias de control transcripcionales y traduccionales dentro del vector sirven para su función propuesta de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y secuencias de control de expresión se
20 eligen para ser compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo se pueden insertar en un vector separado o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se
25 insertan en el vector de expresión por métodos estándares (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el vector y fragmento de gen de anticuerpo, o ligación de extremo romo si no están presentes sitios de restricción).

30 Como se muestra en la FIG. 23, tal estructura

000086

esquemática del vector de expresión para anticuerpo de IgG1/kappa Hu106-222. Procediendo en el sentido de las manecillas del reloj desde el sitio SalI en la parte superior, el plásmido contiene la unidad de transcripción de
5 cadena pesada que inicia con el promotor temprano inmediato principal de citomegalovirus humano (CMV) y mejorador (promotor de CMV) para iniciar la transcripción del gen de cadena pesada de anticuerpo. El promotor de CMV es seguido por el exón de VH, una secuencia genómica que contiene la
10 región constante de cadena pesada gamma-1 humana que incluye los exones CH1, bisagra, CH2 y CH3 con los intrones que intervienen, y el sitio de poliadenilación que sigue el exón CH3. Después de la secuencia de gen de cadena pesada, la unidad de transcripción de cadena ligera comienza con el
15 promotor de CMV, seguido por el exón de VL y una secuencia genómica que contiene el exón de región constante de cadena kappa humana (CL) con parte del intrón que le precede, y el sitio de poliadenilación que sigue el exón CL. El gen de cadena ligera luego es seguido por el promotor temprano de
20 SV40 (promotor de SV40), el gen de xantina guanina fosforribosil transferasa de E. coli (gpt), y un segmento que contiene el sitio de poliadenilación de SV40 (sitio de poli(A) de SV40). Finalmente, el plásmido contiene una parte del plásmido pUC19, que comprende el origen bacteriano de
25 replicación (pUC ori) y gen de beta-lactamasa (beta lactamasa). Las ubicaciones de sitios relevantes de enzima de restricción se muestran en la figura.

El vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de
30 anticuerpo de una célula huésped. El gen de cadena de

006087

anticuerpo se puede clonar en el vector de modo que el péptido señal se enlaza en armazón al amino término del gen de cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal
5 heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no de inmunoglobulina).

Como se señaló anteriormente, además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras
10 que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. El término "secuencia reguladora" se propone que incluya promotores, mejoradores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o
15 traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Se apreciará que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de
20 las secuencias reguladoras puede depender de tales factores como la elección de la célula huésped a ser transformada, el nivel de expresión deseado de la proteína, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de células huéspedes de mamífero incluyen elementos virales que
25 dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o mejoradores derivados de citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/mejorador de CMV), Virus de Simio 40 (SV40) (tal como el promotor/mejorador de SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Para la
30

. 000088

descripción adicional de elementos reguladoras virales, y
secuencias de los mismos, ver por ejemplo, Patente de Estados
Unidos No. 5,168,062 de Stinski, Patente de Estados Unidos
No. 4,510,245 de Bell et al. y Patente de Estados Unidos No.
5 4,968,615 de Schaffner et al., Patente de Estados Unidos No.
5,464,758 de Bujard et al. y Patente de Estados Unidos No.
5,654,168 de Bujard et al.

Además de los genes de cadena de anticuerpo y
secuencias reguladoras, los vectores de expresión
10 recombinantes de la invención pueden portar secuencias
adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación
del vector en células huéspedes (por ejemplo, orígenes de
replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen
marcador seleccionable facilita la selección de células
15 huéspedes en las cuales el vector se ha introducido (ver por
ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nos. 4,399,216, 4,634,665
y 5,179,017, todas de Axel et al.). Por ejemplo, típicamente
el gen marcador seleccionable confiere resistencia a
fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una
20 célula huésped en la cual el vector se ha introducido. Los
genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de
dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en dhfr.sup.-
células huéspedes con selección/amplificación de metotrexato)
y el gen neo (para selección de G418).

25 Para la expresión de las cadenas ligera y pesada,
los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y
ligera son transfectados en una célula huésped por técnicas
estándares. Las diversas formas del término "transfección" se
proponen que abarquen una amplia variedad de técnicas
30 comúnmente utilizadas para la introducción de ADN exógeno en

. 000089

una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, transfección de DEAE-dextrano y similares. Aunque teóricamente es posible expresar los anticuerpos de la invención en células huéspedes ya sea procariotas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y muy preferiblemente células huéspedes de mamífero, es la más preferida debido a que tales células eucariotas, y en particular células de mamífero, tienen más probabilidad que las células procariotas se ensamblen y segreguen un anticuerpo inmunológicamente activo y apropiadamente plegado. Las células huéspedes de mamífero para la expresión de los anticuerpos recombinantes descritos en la presente incluyen células de Ovario de Hámster Chino (células CHO) (tales como células dhfr-CHO, descritas en Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando los genes de anticuerpo que codifican vectores de expresión recombinantes se introducen en células huéspedes de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huéspedes por un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huéspedes o, secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual las células huéspedes crecen. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteína estándares.

Las células huéspedes también se pueden utilizar para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como

000090

fragmentos Fab o moléculas de scFv. Se entenderá que las variaciones en el procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifica
5 ya sea la cadena ligera o la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo de esta invención. La tecnología de ADN recombinante también se puede usar para remover algo o todo el ADN que codifica cualquiera o ambas cadenas ligera y pesada que no son necesarias para el enlace a OX40. Las
10 moléculas expresadas de tales moléculas de ADN truncadas también se abarcan por los anticuerpos de la invención. Además, se pueden producir anticuerpos bifuncionales en los cuales una cadena pesada y una ligera están en un anticuerpo de la invención y la otra cadena pesada y ligera es
15 específica para un antígeno diferente de OX40 reticulando un anticuerpo de la invención a un segundo anticuerpo por métodos de reticulación química estándar.

Composiciones Farmacéuticas y Administración Farmacéutica

20 Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención y un portador farmacéuticamente
25 aceptable. Como se utiliza en la presente, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción, y similares que son
30 fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de portadores

000091

farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina amortiguada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como también combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible
5 incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender adicionalmente cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes
10 humectantes o emulsionantes, conservadores o amortiguadores, los cuales mejoran la vida en anaquel o efectividad del anticuerpo o porción de anticuerpo.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención se pueden incorporar en una composición
15 farmacéutica adecuada para la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas farmacéuticas líquidas, semi-sólidas y sólidas, tales
20 como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración y aplicación terapéutica propuestos. Las composiciones típicas están en la
25 forma de soluciones inyectables o infusibles, tales como composiciones similares a aquellas usadas para la inmunización pasiva de humanos con otros anticuerpos. El anticuerpo se puede administrar por inyección o infusión intravenosa o inyección intramuscular o subcutánea.

30 La ruta y/o modo de administración variará

000092

dependiendo de los resultados deseados. En ciertas modalidades, el compuesto activo se puede preparar con un portador que protegerá el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, 5 incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles biodegradables, tales como acetato de etilenvinilo, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la 10 preparación de tales formulaciones son patentados o generalmente conocidos por aquellos expertos en el arte. Ver, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

15 Los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones. En ciertas modalidades, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se co-formula con y/o co-administra con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratar 20 trastornos en los cuales la inactivación de OX40 es nociva. Por ejemplo, un anticuerpo anti-OX40 o porción de anticuerpo de la invención se puede co-formular y/o co-administrar con uno o más anticuerpos adicionales que enlazan otros objetivos (por ejemplo, anticuerpos que enlazan otras citocinas o que 25 enlazan moléculas de superficie celular). Además, uno o más anticuerpos de la invención se pueden usar en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Tales terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosificaciones menores de los agentes terapéuticos 30 administrados, evitando así posibles toxicidades.

000093

complicaciones asociadas con las diversas monoterapias. Se apreciará por el profesionalista experto que cuando los anticuerpos de la invención se usan como parte de una terapia de combinación, una dosificación menor de anticuerpo puede ser deseable que cuando el anticuerpo solo se administra a un sujeto (por ejemplo, un efecto terapéutico sinergista se puede lograr a través del uso de terapia de combinación la cual, a su vez, permite el uso de una dosis inferior del anticuerpo para lograr el efecto terapéutico deseado.

10 Los anticuerpos descritos en la presente, o porciones de enlace de antígeno de los mismos se pueden usar solos o en combinación para tratar tales enfermedades. Se debe entender que estos anticuerpos o porción de enlace de antígeno de los mismos se pueden usar solos o en combinación
15 con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, el agente adicional se selecciona por el artesano experto para su propósito propuesto. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en el arte como siendo útil para tratar la enfermedad o afección que es
20 tratada por el anticuerpo señalado en la presente. El agente adicional también puede ser un agente el cual imparte un atributo benéfico a la composición terapéutica por ejemplo, un agente el cual rige la viscosidad de la composición.

 Las composiciones farmacéuticas descritas en la
25 presente pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a dosificaciones y por período de tiempo
30 necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado.

000094

cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o porción de anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo; y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para producir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es una en la cual cualquiera de los efectos tóxicos o nocivos del anticuerpo o porción de anticuerpo se compensa por los efectos terapéuticamente benéficos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a dosificaciones y por períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, un bolo único se puede administrar, diversas dosis divididas se pueden administrar con el tiempo o la dosis se puede reducir o incrementar proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en formas farmacéuticas unitarias para la fácil administración y uniformidad de dosificación. La forma farmacéutica unitaria como se usa en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación de las formas farmacéuticas unitarias se dicta por y es directamente dependiente de (a) las características únicas del compuesto

000095

activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular a ser logrado, y (b) las limitaciones inherentes en el arte de composición de tal compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

5

EJEMPLO I

Los anticuerpos monoclonales de IgG1/kappa 106-222 quiméricos y humanizados (Ch222 y Hu222, respectivamente) se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo de los transfectantes estables NS0 correspondientes usando una columna de proteína A como se describe en los Apéndices A y B. Hu222 se eluyó de la columna por dos maneras diferentes. Brevemente, Hu222 Lote I se eluyó con amortiguador de bajo pH y el Lote II con Amortiguador de Elución de Ag/Ab Ligero de Pierce. El rendimiento de Hu222 fue mejor cuando el amortiguador de pH bajo se utilizó para elución. Ch222 se eluyó de la columna con Amortiguador de Elución de Ag/Ab Ligero.

Los anticuerpos de Hu222 Lote I y II purificados se caracterizaron por SDS-PAGE junto con 106-222 de ratón de acuerdo con los procedimientos estándares. Cinco µg de cada anticuerpo se analizaron bajo condiciones de reducción. Como se muestra en la FIG. 21, cada uno de los anticuerpo Hu222 Lote I y II está comprendido de una cadena pesada con un peso molecular de aproximadamente 50 kD y una cadena ligera con un peso molecular de aproximadamente 25 kD. La pureza de los anticuerpos Hu222 Lote I y II parece ser más de 95%.

La contaminación por endotoxina en los anticuerpos humanizados se analizó con kit QCL-1000 de Lisado de

000096

Amebocitos de Limulus de Lonza (LAL). El nivel de endotoxina fue menor que 0.5 EU/mg de proteína para ambos anticuerpos Hu222 Lote I y Lote II.

5 **Caracterización de Hu106-222 para enlazar células L/OX40**

El enlace de anticuerpos 106-222, Ch106-222 y Hu106-222 de ratón a OX40 se examinó en un ensayo de enlace de FACS con células L/hOX40 esencialmente de acuerdo con el protocolo suministrado por la Dr. Laura Bover. Los anticuerpos enlazados a células L/hOX40 se detectaron con anticuerpo de IgG anti-ratón de cabra etiquetado con PE (para 106-222 de ratón) o anticuerpo de IgG anti-humano de cabra etiquetado con PE (para Ch106 y Hu106).

La FIG. 22 muestra el análisis de anticuerpos 106-222, Ch106 y Hu106-222 (Lote II) de ratón para enlazar células L/OX40. La curva de titulación de Hu106-222 (Lote II) fue casi idéntica a aquella de Ch106-222, indicando que la afinidad de enlace de antígeno de 106-222 de ratón es retenida en Hu106-222. La curva de titulación de 10-222 de ratón fue similar a aquella de Ch106 y Hu106; sin embargo, debido a la diferencia de los anticuerpos secundarios, los datos solamente indican que la afinidad de 106-222 de ratón es similar a aquella de Hu106-222.

La FIG. 24 muestra la comparación entre los anticuerpos Hu106-222 Lote I y II para enlazar células L/hOX40. Aunque es necesario el análisis adicional, la afinidad de los dos lotes de Hu-106-222 pareció ser similar, si no idéntica, entre sí. Por lo tanto, la elución ácida de Hu106-222 de una columna de proteína A no parece afectar su afinidad.

000097

Purificación de Ch106-222

El transfectante estable NS0 C8 creció en 500 ml de medio de Hibridoma SFM de Invitrogen en una botella de cultivo rotatoria hasta el agotamiento. El cultivo se giró en Tubo de Centrífuga de 250 ml de Corning (Cat# 430776) en Centrífuga Allegra X-12R de Beckman Coulter (2000 RPM durante 15 min). El sobrenadante de cultivo se cargó sobre una columna GE Healthcare HiTrap MabSelect SuRe de 1 ml (Cat# 11-034-95) usando una bomba Pharmacia P1. La columna se lavó con solución salina amortiguada con Tris (Pierce, Cat# 28379) y se eluyó con Amortiguador de Elución de Ag/Ab Ligero de Pierce (Cat # 21027). Las fracciones (aproximadamente 1 ml) se colectaron y se leyó su OD a 280 nm.

15

Fracción #	OD a 280 nm
3	0.12
4	0.30
5	0.18
6	0.11

20

Las fracciones 3 a 6 se agruparon (volumen = 3.0 ml, OD a 280 nm = 0.14). Las fracciones agrupadas se desalaron sobre una columna de medio Sephadex G25 de 10 ml en PBS. Las fracciones de 1 ml se colectaron.

25

Fracción #	OD a 280 nm
5	0.09
6	0.19
7	0.12
8	0.12
9	0.00

30

Las fracciones 6 a 9 se agruparon (volumen = 3.0

000098

ml, OD a 280 nm = 0.11). Las fracciones agrupadas se dializaron durante la noche en PBS. Después de la diálisis, el volumen fue 3.0 ml y la OD a 280 nm fue 0.19. Esta preparación es llamada Ch106, lote 8/31/09, con una
5 concentración de 0.13 mg/ml.

Purificación de Hu106-222

El transfectante estable NS0 1-C6 creció en 500 ml de medio de Hibridoma SFM de Invitrogen en una botella de
10 cultivo rotatoria hasta el agotamiento. El cultivo se giró en Tubo de Centrífuga de 250 ml de Corning (Cat# 430776) en Centrífuga Allegra X-12R de Beckman Coulter (2000 RPM durante 15 min).

Lote 1: 150 ml del sobrenadante de cultivo se
15 cargaron sobre una columna GE Healthcare HiTrap MabSelect SuRe de 1 ml (Cat# 11-034-95) usando una bomba Pharmacia P1. La columna se lavó con PBS y el anticuerpo enlazado se eluyó con 0.1 M glicina-HCl, 0.1 M NaCl (pH 3.0). Las fracciones eluidas (1 ml cada una) se colectaron en tubos que contienen
20 50 µl de 1M Tris-HCl (pH 8.0).

Fracción #	OD a 280 nm
2	0.88
3	2.84
4	1.29
5	0.63
6	0.18

La fracciones 2 a 5 se agruparon (volumen = 4.2 ml, OD a 280 nm = 1.59). Las fracciones agrupadas se dializaron durante la noche en PBS. Después de la diálisis, el volumen
30 fue 4.2 ml y la OD a 280 nm fue 1.54. La solución de

- 000099

anticuerpo (lote 9/18/09 I; 1.1 mg/ml) se esterilizó en
filtró.

Lote II:

5 El sobrenadante de cultivo restante (350 ml) se
cargó en una columna GE Healthcare HiTrap MabSelect SuRe de 1
ml usando una bomba Pharmacia P1. La columna se lavó con
solución salina amortiguada con Tris y se eluyó con
Amortiguador de Elución de Ag/Ab Ligero. Las fracciones
10 (aproximadamente 1 ml) se colectaron y su OD se leyó a 280
nm.

Fracción #	OD a 280 nm
2	0.12
3	0.85
4	2.17
5	1.47
6	1.02
7	0.81
8	0.66
9	0.54
10	0.44
11	0.46

Las fracciones 3 a 7 se agruparon (volumen = 4.2
ml, OD a 280 nm = 1.22). La columna se lavó de nuevo con
solución salina amortiguada con Tris y el anticuerpo se eluyó
25 con 0.1M glicina-HCl, 0.1M NaCl (pH 3.0) para examinar si la
elución por Amortiguador de Elución de Ag/Ab Ligero fue
eficiente.

Fracción #	OD a 280 nm
1	0.05
2	0.05
3	1.23
4	0.49
5	0.10

000100

Las fracciones 3 a 7 eluidas con Amortiguador de Elución de Ag/Ab Ligero se agruparon y desalaron sobre una columna de medio Sephadex G25 de 10 ml en PBS. Las fracciones de 1 ml se colectaron.

5

Fracción #	OD a 280 nm
4	0.38
5	0.96
6	1.38
7	1,33
8	1.10
9	0.12

10

Las fracciones 5 a 8 se agruparon (volumen = 4.0 ml, OD a 280 nm = 1.12). Las fracciones agrupadas se dializaron durante la noche en PBS. Después de la diálisis, el volumen fue 4.0 ml y la OD a 280 nm fue 1.12. La solución de anticuerpo (lote 9/18/09 II; 0.8 mg/ml) se esterilizó en filtro.

El método de elución de alta sal con Amortiguador de Elución de Ag/Ab Ligero de Pierce no fue tan eficiente como el método de pH bajo para eluir el anticuerpo de IgG1 humano enlazado de la columna de proteína A. Como los anticuerpos no se eluyeron en un pico agudo con Amortiguador de Elución de Ag/Ab Ligero, fue necesario agrupar muchas fracciones para colección de IgG eluida y desalar las fracciones agrupadas antes de la diálisis. El pobre perfil de elución con Amortiguador de Elución de Ag/Ab Ligero y la etapa de purificación extra afectaron el rendimiento del anticuerpo. Se contempló que el método de elución de alta sal se usa solamente si la IgG a ser purificada es inestable al ácido.

000101

Ejemplo II**Purificación de anticuerpos Ch119-122 y Hu119-122**

El anticuerpo monoclonal de IgG1/kappa 119-122
5 quimérico (Ch119) se purificó del sobrenadante de cultivo del
transfectante estable NS0 correspondiente (clon G11) crecido
en medio de Hibridoma-SFM (Invitrogen) usando una columna de
proteína A. Después de la elución con Amortiguador de Elución
de Ag/Ab Ligero de Pierce, el amortiguador de Ch119 se
10 intercambió a PBS por filtración en gel y luego diálisis. La
concentración de Ch119 fue 0.21 mg/ml.

El anticuerpo monoclonal de IgG1/kappa 119-122
humanizado (Hu122) se purificó del sobrenadante de cultivo
del transfectante estable NS0 correspondiente (clon 2F5)
15 crecido en medio de Hibridoma-SFM usando una columna de
proteína A. El Hu106-222 se eluyó de la columna con
amortiguador de bajo pH, se neutralizó con 1 M Tris-HCl (pH
8.0), y se dializó en PBS. La concentración de Hu122 fue 1.6
mg/ml.

20 El Hu106-222 purificado se caracterizó por SDS-PAGE
junto con 119-122 de ratón de acuerdo con los procedimientos
estándares. Cinco µg de cada anticuerpo se analizaron bajo
condiciones de reducción. Como se muestra en la FIG. 25,
Hu119-122 está comprendido de una cadena pesada con un peso
25 molecular de aproximadamente 50 kD y una cadena ligera con un
peso molecular de aproximadamente 25 kD. La pureza de Hu119
pareció ser más de 95%.

Caracterización de Hu119-122 para enlazar células L/hOX40

30 El enlace de anticuerpos 119-122, Ch119-122 y

000102

Hu119-122 de ratón a OX40 se examinó en un ensayo de enlace de FACS con células L/OX40 esencialmente de acuerdo con el protocolo suministrado por la Dr. Laura Bover. Los anticuerpos enlazados a células L/OX40 se detectaron con anticuerpo de IgG anti-ratón de cabra etiquetado con PE (para 5 119-122 de ratón) o anticuerpo de IgG anti-humano de cabra etiquetado con PE (para Ch119-122 y Hu119-122).

La FIG. 26 muestra el resultado del análisis de FACS. La curva de titulación de Hu119-122 fue similar a 10 aquella de Ch119-122, sugiriendo que la afinidad de enlace de antígeno de 119-122 de ratón es retenida en Hu119-122. Sin embargo, los valores de MCF a concentraciones de anticuerpo mayores de Ch109-122 y Hu119-122 no caen rectos en las curvas correspondientes. Después de ajustar las condiciones 15 experimentales, el análisis de FACS se debe repetir.

EJEMPLO III

Para evaluar la capacidad de nuestros anticuerpos OX40 anti-humanos humanizados para mejorar la proliferación 20 de células T, se realizaron ensayos de proliferación usando células CD32-L recubiertas con anti-CD3 y células T CD4⁺ naïve recientemente clasificadas. La FIG. 27 muestra que el clon de mAb OX40 anti-humano humanizado 119-122 (Hu122), y su anticuerpo mutado de enlace de FcR (Hu122-AA) mejoraron la 25 proliferación de células T CD4⁺ naïve. Hu122 produjo mejor actividad estimulante de células T en comparación con mAb OX40 anti-humano de ratón parental (122 de ratón) (FIG. 27).

El clon de mAb OX40 anti-humano humanizado mutado de enlace de FcR 106-222 (Hu222-AA) y clon de mAb OX40 anti- 30 humano quimérico 106-222 (Ch222) mejoraron la proliferación

000103

de células T $CD4^+$ naïve estimulada con anti-CD3. Estos anticuerpos tienen actividad estimulante similar en comparación con el mAb OX40 anti-humano de ratón parental (106-222 de ratón). Sin embargo, el Ab OX40 anti-humano
 5 completamente humanizado, Hu106, no mejora la proliferación de células T (FIG. 28).

Para evaluar la capacidad de anticuerpos OX40 anti-humanos humanizados para bloquear la función supresora de células T reguladoras (Tregs) $CD4^+$, se realizaron ensayos de
 10 proliferación utilizando células T $CD4^+$ naïve recientemente clasificadas y Tregs $CD4^+CD25^{alta}CD127^{baja}$. Se encontró que el anticuerpo quimérico Ch122 y anticuerpo humanizado mutado de enlace de Fc (Hu122-AA) exhibieron mejor potencia que el mAb OX40 anti-humano de ratón parental (122 de ratón) en el
 15 bloqueo de la función supresora de Treg $CD4^+$ (FIG. 29 A-B).

En el experimento de la FIG. 27, las células T naïve $CD4^+CD25^{baja}CD127^+CD45RO^-CD45RA^+$ recientemente clasificadas se estimularon con células L que expresan CD32 (CD32-L) recubiertas con 4 concentraciones de anticuerpos
 20 anti-CD3 más 2 $\mu g/ml$ de anticuerpos 119 de clon de Ab OX40 anti-humano o anticuerpos de control. Tres días después de la estimulación, se agregó radioisótopo tritio y se cultivó por 16-18 horas adicionales antes de la recolección celular. Los datos son un representativo de los experimentos de dos
 25 donantes. El ligando de hOX40 que expresa células CD32-L (CD32-L/hOX40L) sirve como control positivo, mientras que la IgG1 humana y de ratón sirven como controles negativos.

En el experimento de la FIG. 28, las células T $CD4^+$ naïve recientemente clasificadas se estimularon con células
 30 CD32-L recubiertas con 4 concentraciones de anticuerpos anti-

CD3 más 2 µg/ml de anticuerpos 106-222 de clon de mAb OX40 anti-humano (Hu222) o anticuerpos de control. Tres días después de la estimulación, se agregó el radioisótopo tritio y se cultivó por 16-18 horas adicionales antes de la recolección celular. Los datos son representativos de experimentos de dos donantes. CD32-L/hOX40L sirve como control positivo, mientras que la IgG1 humana y de ratón sirven como controles negativos.

En el experimento de la FIG. 29, las células T CD4⁺ naïve recientemente clasificadas se cultivaron en la presencia de Tregs CD4⁺CD25^{alta}CD127^{baja} a tres relaciones de Tregs:T efectoras y se estimularon con células CD32-L recubiertas con 0.2 µg/ml de anticuerpos anti-CD3 más 10 µg/ml de anticuerpos 119-122 de clon de mAb OX40 anti-humano o anticuerpos de control. Tres días después de la estimulación, se agregó el radioisótopo tritio y se cultivó por 16-18 horas adicionales antes de la recolección celular. Los datos son representativos de tres experimentos. CD32-L/hOX40L sirve como control positivo, mientras que la IgG1 humana y de ratón sirven como controles negativos.

EJEMPLO IV

Puesto que los anticuerpos encontrarán células mononucleares de sangre periférica totales (PBMCs) cuando se administran a pacientes vía inyección intravenosa, se probó la capacidad de nuestros anticuerpos OX40 anti-humanos para estimular la proliferación de células T usando PBMCs como células que presentan antígeno (APCs) nuestros ensayos de proliferación. Sin embargo, se obtuvieron datos altamente variables con nuestros mAbs OX40 anti-humanos de ratón cuando

000105

se usan PBMCs como APCs que no se ve cuando se usan monocitos como APCs, sugiriendo que nuestros anticuerpos requieren algún tipo de reticulación para la actividad. Para probar esta posibilidad, las placas se recubrieron con nuestro mAbs OX40 anti-humanos y anti-CD3, se lavaron, y se utilizaron para estimular la proliferación de células T CD4⁺ o CD8⁺ en la ausencia de células auxiliares. La FIG. 30 muestra los resultados que los anticuerpos OX40 anti-humanos mejoran la proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺.

1x10⁵ células T naïve CD4⁺CD25^{baja}CD45RO⁻CD45RA⁺ recientemente clasificadas (FIG. 30A) o células T CD3⁺CD8⁺ (FIG. 30B) se estimularon con anti-CD3 de unión a la placa (3 µg/ml) y mAb OX40 anti-humano de ratón (2 µg/ml). Se agregó timidina tritiada en el tercer día de cultivo y las células se recolectaron después de otras 15 horas de incubación. La proliferación de células T se evaluó por incorporación de timidina. Los mAbs OX40 anti-humanos se derivaron de tres fusiones de hibridoma. Los números después del número de fusión denotan un anticuerpo específico. IgG1 de ratón y 119-42 sirvieron como controles negativos. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Se muestran los datos representativos de 4 donantes de células T. (FIG. 30C) Todas las tres versiones de mAbs OX40 anti-humanos humanizados [Hu106-222 y Hu119-122; Hu106-222AA y Hu119-122AA (AA denota que dos de los residuos de enlace de Fc fueron mutados al aminoácido alanina); y Ch119-122 (similar al 119-122 humanizado excepto que se mantuvo la región variable de ratón "paratope")] estimularon la proliferación de células T CD4⁺ naïve. Anti-CD28 sirvió como un control positivo.

Como se muestra en la FIG. 30, los paneles A y B,

000106

muestran que los mAbs OX40 anti-humanos de ratón de unión a la placa estimulan de manera potente la proliferación de células T CD4⁺ naïve y células T CD8⁺ por un rango de 10 a 40 veces. Se extendieron los estudios a nuestros mAbs OX40 anti-humanos humanizados y se encontró que las tres versiones de nuestros anticuerpos humanizados, si son completamente humanizados, quiméricos o tienen mutantes AA en los cuales los residuos responsables del enlace al receptor de Fc se alteraron a alanina, fueron potentes estimulantes de proliferación de células T CD4⁺ naïve (FIG. 30C).

La FIG. 31 muestra que los anticuerpos OX40 anti-humanos humanizados y de ratón requieren reticulación para mejorar la proliferación de células T. Las células T CD4⁺ naïve recientemente clasificadas se estimularon con anti-CD3 de unión a la placa (3 µg/ml) más mAbs OX40 anti-humanos humanizados solubles o de unión a la placa (2 µg/ml) en la ausencia de células auxiliares. La timidina tritiada se agregó en el tercer día del cultivo y las células se recolectaron después de otras 15 horas de incubación. La proliferación de células T se evaluó por incorporación de timidina. IgG1 de ratón y anti-CD28 sirvieron como controles negativo y positivo, respectivamente. Se muestran los datos representativos de dos donantes. Las células T CD4⁺ naïve se estimularon con anti-CD3 de unión a la placa en la ausencia de células auxiliares. Al siguiente día, el mAb OX40 anti-humano 119-122 (2 µg/ml) se agregó solo o en combinación con una cantidad igual de un anticuerpo secundario contra FC. La proliferación celular se evaluó como se describe en el panel A.

La potencia de nuestros mAbs OX40 anti-humanos

000107

humanizados Hu106-222 y Hu119-122 fue comparable con aquella de anti-CD28. En contraste, cuando el anticuerpo OX40 anti-humano soluble se agregó al cultivo de células T, el efecto estimulante se abolió. (FIG. 31A). Sin embargo, cuando el mAb OX40 anti-humano soluble 119-122 se agregó junto con una IgG anti-ratón de cabra de fragmento $F(ab')_2$, el anticuerpo secundario específico de fragmento Fc, el efecto estimulante se restauró (FIG. 31B). Estos resultados demuestran que los mAbs OX40 anti-humanos requieren la reticulación para sus actividades biológicas.

Para evaluar la capacidad de nuestros mAbs OX40 anti-humanos agonistas para bloquear la función supresora de Tregs $CD4^+CD25^{alta}CD127$, se realizaron ensayos de proliferación en la presencia de células T efectoras $CD4^+CD25^{baja}CD127+CD45RO^+$ (Teff) y nTregs $CD4^+$. Usando nuestro sistema de unión a la placa en el cual los mAbs OX40 anti-humanos junto con anti-CD3 se recubrieron en una placa y en la ausencia de células auxiliares, doce (222, 132, 8B, 33A, 43, 58B, 122, 157A, 173B, 220C, 140A, 270) de nuestros mAbs OX40 anti-humanos de ratón inhibieron de manera potente la supresión de nTreg (FIGS. 32A y 32B). Aunque la relación de nTregs a células T efectoras usada en estos ensayos fue 1:1, estos anticuerpos fueron capaces de estimular células T efectoras para proliferar 10 a 35 por ciento arriba del porcentaje logrado por las células T efectoras en la ausencia de nTregs. Los mAbs OX40 anti-humanos humanizados también invirtieron la función supresora de nTregs a niveles similares (FIG. 32C). Estos resultados tomados conjuntamente sugieren que los mAbs OX40 anti-humanos de ratón son potentes estimulantes de OX40, resultando en el mejoramiento

000108

significativo de proliferación de células T e inhibición de la función supresora de nTreg. Además, los mAbs OX40 anti-humanos humanizados mantuvieron las potentes actividades biológicas de sus anticuerpos de ratón parentales.

5 La FIG. 32 muestra que el mAb OX40 anti-humano bloquea la actividad de Tregs $CD4^+FOXP3^+$. Las células T efectoras $CD4^+CD25^-CD45RO^+$ etiquetadas con CFSE y Tregs $CD4^+FOXP3^+$ se derivaron del mismo donante sano. Las células T se estimularon con anti-CD28 soluble (0.5 μ g/ml) y anti-CD3
10 de unión a la placa (3 μ g/ml) y mAbs OX40 anti-humanos (2 μ g/ml). La proliferación de células T efectoras se evaluó por citometría de flujo para dilución de CFSE. La relación de células nTregs a T efectoras fue 1:1. IgG1 de ratón sirvió como control negativo. Las células T $CD4^+$ naïve sirvieron
15 como células T de control para demostrar la inhibición específica de la proliferación de células T efectoras por nTregs. La FIG. 32A son unos datos representativos de FACS que muestran la proliferación de células T efectoras en la presencia de células T $CD4^+$ naïve, nTregs o nTregs más mAb
20 OX40 anti-humano 119-33A. La FIG. 32B muestra el porcentaje de proliferación de células T efectoras en la presencia de nTregs después del tratamiento con un mAb OX40 anti-humano de ratón (20 probados). La FIG. 32C muestra que todas las tres versiones de mAbs OX40 anti-humanos humanizados restauraron
25 la proliferación de células T efectoras.

Un reciente reporte sugiere que la activación de OX40 puede inducir la apoptosis de una línea de células T humanas que expresa OX40 (Yoshiaki Takahashi et al., 200B, Aids Research and human Retroviruses,24). Por lo tanto se
30 probó el efecto de las concentraciones incrementadas del mAb

OX40 anti-humano 106-222 más una dosis baja fija de anti-CD3 en la supervivencia de tres subconjuntos de células T en la presencia de monocitos. La FIG. 33A muestra que las altas concentraciones de mAb OX40 anti-humano 106-222 (20-30 µg/ml) preferentemente matan nTregs FOXP3⁺ activadas mientras que las células T CD4⁺ naïve y de memoria activadas fueron ya sea resistentes o menos susceptibles a este esfuerzo. Para probar si el mAb OX40 anti-humano actúa directamente en Tregs para inducir la muerte celular, se realizaron nuevos experimentos en la ausencia de células auxiliares. La FIG. 33B muestra que la fuerte señalización de OX40 en combinación con anti-CD3 específicamente mata nTregs en la ausencia de células auxiliares. Para confirmar si los efectos de aniquilación mediados por mAb OX40 anti-humanos imitan la activación de OX40 por ligando de OX40 natural, se utilizó una línea de célula L de fibroblasto de ratón que sobre-expresa hOX40L y se utilizó para estimular nTregs en la presencia de una dosis baja de anti-CD3 y se obtuvieron efectos de aniquilación similares en Tregs (FIG. 33C). Estos resultados sugieren que la fuerte activación de OX40 mata las células Tregs que expresan OX40.

Específicamente, la FIG. 33 muestra que la alta concentración de mAb OX40 anti-humano preferentemente mata Tregs FOXP3⁺. En la FIG. 33A, los subconjuntos de células T (naïve, CD4⁺CD25^{baja}CD127⁺CD45RO⁻CD45RA⁺; memoria, CD4⁺CD25^{baja}CD127⁺CD45RA⁻CD45RO⁺; y nTregs, CD4⁺CD25^{alta}CD127^{baja}) se cultivaron con una relación igual de monocitos CD14⁺ en la presencia de anti-CD3 soluble (0.3 µg/ml) y concentraciones incrementadas del mAb OX40 anti-humano de ratón 106-222. La viabilidad celular se determinó después de 3 días de cultivo

000110

por análisis de citometría de flujo, sincronizando los linfocitos viables. Se muestran los datos de dos donantes de células T. Las FIGS. 33B y 33C muestran que la fuerte activación de OX40 mata Tregs CD4⁺FOXP3⁺. La FIG. 33B muestra
 5 que las Tregs CD4⁺FOXP3⁺ se estimularon con anti-CD3 de unión a la placa (2 µg/ml) más mAb 119-122 soluble (30 µg por millón de células) o anticuerpo de control de IgG1 de ratón. Las células vivas negativas a azul de tripano después de un día de cultivo se contaron con un hemacitómetro. La FIG. 33C
 10 muestra que las Tregs CD4⁺FOXP3⁺ se estimularon con anti-CD3 soluble (0.2 µg/ml) más células L o células L que expresan el ligando de hOX40 (L/hOX40L). Las células vivas se contaron después de un día de estimulación.

A continuación se busca determinar si el mAb OX40
 15 anti-humano actúa directamente en células T para bloquear la función supresora de nTreg. Las nTregs o células T efectoras CD4⁺ recientemente clasificadas se pre-activaron durante la noche con anti-CD3 y luego se pulsaron con mAbs OX40 anti-humanos por 4 horas. Las células T efectoras luego se
 20 lavaron, se etiquetaron con CFSE, y se co-cultivaron con nTregs en la presencia de un número igual de monocitos CD14⁺ y anti-CD3. De manera similar, la nTregs pre-estimuladas se lavaron y cultivaron con células T efectoras etiquetadas con CFSE no tratadas.

25 La FIG. 34 muestra que los mAbs OX40 anti-humanos actúan directamente en células T para bloquear la función supresora de Tregs. La FIG. 34A muestra que el mAb OX40 anti-humano actúa directamente en células T efectoras de memoria para conferirles resistencia a la supresión por nTregs. Las
 30 células T de memoria CD4⁺ CD25^{baja}CD127⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ se

000111

estimularon con anti-CD3 de unión a la placa (0.8 µg/ml) en medio de cultivo (RPMI/10% FCS/ P/S más IL-2 a 30 IU/ml) por 12 horas, luego se pulsaron con mAb OX40 anti-humano (119-122, 22 µg por 0.5 millones de células) en medio de cultivo, por 4 horas, se lavaron 3 veces, y 8×10^4 células T efectoras etiquetadas con CFSE se cultivaron con relaciones disminuidas de nTregs. La proliferación de células T efectoras se evaluó por citometría de flujo para dilución de CFSE. El mAb OX40 anti-humano actúa en Tregs haciéndolas incapaces de suprimir la proliferación de células T efectoras (FIG. 34B). Las nTregs $CD4^+CD25^{alta}CD127^{baja}$ se pre-estimularon con anti-CD3 de unión a la placa (2 µg/ml) en medio de cultivo por 12 horas, luego se pulsaron con un mAb OX40 anti-humano, 119-122 o 106-222, o un anticuerpo de control, anti-ICOS o IgG1 de ratón, como se describe en el panel A, se lavaron y cultivaron con células T efectoras de memoria etiquetadas con CFSE. La proliferación de células T efectoras se evaluó por citometría de flujo para dilución de CFSE.

Las células T efectoras tratadas con mAb OX40 anti-humano llegaron a ser resistentes a la supresión por células nTreg. (FIG. 34A) En contraste, la proliferación de células T efectoras tratadas con anticuerpo de ratón de IgG1 de ratón permaneció susceptible a la supresión por nTregs. La FIG. 34B muestra que las nTregs tratadas con mAbs OX40 anti-humanos fueron incapaces de suprimir la proliferación de células T efectoras. En contraste, las nTregs tratadas con anticuerpos de control, tales como anti-ICOS o IgG1 de ratón, permanecieron supresoras. Estos resultados sugieren que los mAbs OX40 anti-humanos actúan directamente tanto en células T efectoras como nTregs para restaurar la proliferación de

células T efectoras.

EJEMPLO v

Los datos preliminares complementarios *in vivo* muestran que el anticuerpo OX40 anti-humano que funciona en ratones mejora la expansión de células T y rechazo de tumor en ratones. Se mostró previamente que el mAb OX40 anti-humano puede activar específicamente la cascada de NF- κ B en células T CD8⁺ de ratón transducidas con OX40 humano. Para determinar si el mAb anti-hOX40 puede mejorar el rechazo de tumor promoviendo la supervivencia de células T efectoras CD8⁺ y expansión clonal *in vivo*, las células T Pmel CD8⁺ transgénicas transducidas con el gen de luciferasa y hOX40 se transfirieron adaptativamente en ratones albinos C57BL/6 que portan tumores MC38 no pigmentados. Después de la transferencia adoptiva de las células T transducidas, los ratones se trataron con Abs. Se encontró que significativamente células T OX40⁺ de luciferasa⁺ Pmel humanas migran en el pulmón en el día 4 en ratones tratados con mAb anti-hOX40 en comparación con ratón tratado con anticuerpo de control de IgG1 (FIG. 35B), indicando que la activación de hOX40 en ratones promovió la expansión de células T CD8⁺. En el día 8 (datos no mostrados) y día 12 después del tratamiento, se encontró que el mismo grupo de ratones tratados con mAb anti-hOX40 retuvo significativamente más células T de luciferasa⁺Pmel en el sitio de tumor en comparación con el grupo de control de ratones tratados con IgG1 (FIG. 35B), de nuevo indicando que la activación de hOX40 en ratones promovió la supervivencia de células T CD8⁺. Finalmente, los tamaños de tumor de ratones que recibieron

000113

células T hOX40⁺Pmel CD8⁺ y subsecuentemente tratados con mAb anti-hOX40 fueron significativamente menores en comparación con aquellos de ratones que recibieron células T Pmel no transducidas y tratados con mAb anti-hOX40 o células T hOX40⁺Pmel seguido por tratamiento con anticuerpo de igualación de IgG1 de ratón de control. Estos resultados muestran que la activación de OX40 humano en ratones resulta en efectos biológicos similares a aquellos de OX40 de ratón (Gough MJ et, 2008). Por lo tanto, los datos demuestran la capacidad de mAb OX40 anti-humano para estimular la expansión de células T CD⁺ y supervivencia *in vivo* y mejorar el rechazo de tumor.

El mAb OX40 anti-humano promueve la expansión de células T y supervivencia *in vivo*.

El régimen de vacunación terapéutico se muestra en la FIG. 35A. Ratones albinos C57BL/6 en grupos de 5 se implantaron subcutáneamente (S.C) con 5×10^5 células de tumor MC38/gp100 no pigmentadas (día 0). En el día 6, la linfopenia fue inducida por la administración de una dosis de radiación de 350 cGy. En el día 7, 1×10^6 células T Pmel-1 de luciferasa transducidas con o sin expresión de OX40 humano se transfirieron adoptivamente en ratones que portan tumor (n = 5 por grupo), seguido por inyección intravenosa de 5×10^5 DCs pulsada con péptido Gp100. La IL-2 humana recombinante se administró intraperitonealmente por 3 días después de la transferencia de células T. Los anticuerpos se administraron en los días 7, 9 y 11 con 100, 50 y 50 µg, respectivamente, por inyección por ratón (FIG. 35B). Las imágenes de

000114

bioluminiscencia *in vivo* mostraron acumulación de células T CD8⁺ pmel-1 que expresan luciferasa en el pulmón y sitios de tumor en los días 4 y 12. Se muestran dos de cinco ratones por grupo en el día 4 y día 12 (FIG. 35C). Los tumores respondieron a los tratamientos usando mAb anti-hOX40. El tamaño de tumor se midió cada 3 días. Pmel-1 y Pmel-1 más IgG1 de ratón sirvieron como controles.

000115

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado el cual enlaza OX40, caracterizado porque comprende: (a) una región variable de
5 cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1; (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2; (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que
comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO. 3; (d)
_10 una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO. 7; (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO. 8; y (f) una región variable de
cadena ligera CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos
15 de SEC ID NO. 9.

2. Un anticuerpo aislado el cual enlaza OX40, caracterizado porque comprende: (a) una región variable de
cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 13; (b) una región variable de cadena pesada
20 CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 14; (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que
comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO. 15; (d)
una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEC ID NO. 19; (e) una región
25 variable de cadena ligera CDR2 que comprende la secuencia de
aminoácidos de SEC ID NO. 20; y (f) una región variable de
cadena ligera CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos
de SEC ID NO. 21.

3. Un anticuerpo aislado que enlaza OX40,
30 caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos

. 000116

SEC ID NO. 7 o 19, o un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos con 90 por ciento de homología con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7 o 19.

4. Un anticuerpo aislado que enlaza OX40, caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO. 8 o 20, o un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos con 90 por ciento de homología con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 8 o 20.

5. Un anticuerpo aislado que enlaza OX40, caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO. 9 o 21, o un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos con 90 por ciento de homología con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9 o 21.

6. Un anticuerpo aislado que enlaza OX40, caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO. 1 o 13, o un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos con 90 por ciento de homología con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1 o 13.

7. Un anticuerpo aislado que enlaza OX40, caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO. 2 o 14, o un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos con 90 por ciento de homología con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2 o 14.

8. Un anticuerpo aislado que enlaza OX40, caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO. 3 o 15, o un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos con 90 por ciento de homología con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 3 o 15.

9. Un anticuerpo aislado que enlaza un epítipo en OX40 reconocido por un anticuerpo, caracterizado porque tiene

000117

una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO. 5 o 17 y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO. 11 o 23, o un anticuerpo que tiene
5 las secuencias de aminoácidos con al menos 90 por ciento de homología con esta.

10. Un anticuerpo aislado el cual enlaza OX40, caracterizado porque comprende una región variable de cadena ligera que tiene CDRs que comprenden las secuencias de
10 aminoácidos de SEC ID NO: 7 o 19, SEC ID NO: 8 o 20, SEC ID NO: 9 o 21, o un anticuerpo que tiene las secuencias de aminoácidos con al menos 90 por ciento de homología con esta.

11. Un anticuerpo aislado el cual enlaza OX40, caracterizado porque comprende, una región variable de cadena
15 pesada que tiene CDRs que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 1 o 13, SEC ID NO: 2 o 14, SEC ID NO: 3 o 15, o un anticuerpo que tiene las secuencias de aminoácidos con al menos 90 por ciento de homología con esta.

12. Ácido nucleico aislado, caracterizado porque
20 codifica el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

13. Una célula huésped, caracterizada porque comprende ácido nucleico que codifica el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

25 14. Un método para producir un anticuerpo, caracterizado porque comprende la etapa de cultivar la célula huésped de conformidad con la reivindicación 13.

15. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque adicionalmente comprende recuperar
30 el anticuerpo de la célula huésped.

000118

16. Un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado para uso como un medicamento.

5 17. Un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune.

18. Un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado para uso en el tratamiento de cáncer.

10 19. Uso de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reclamaciones 1 a 11, en la manufactura de un medicamento, en donde el medicamento es para el tratamiento de cáncer o una enfermedad autoinmune.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se describen anticuerpos humanos, preferiblemente anticuerpos humanos recombinantes, tanto humanizados como quiméricos, los cuales enlazan específicamente a OX40 humano.

5 Los anticuerpos preferidos tienen alta afinidad para el receptor OX40 y activan el receptor *in vitro* e *in vivo*. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa o una porción de enlace de antígeno del mismo. Los anticuerpos, o porciones de anticuerpo, son útiles para modular la actividad
10 de receptor, por ejemplo, en un sujeto humano que sufre de un trastorno en el cual la actividad de OX40 es perjudicial. Se proporcionan ácidos nucleicos, vectores y células huéspedes para expresar los anticuerpos humanos recombinantes, y también se proporcionan métodos para sintetizar los
15 anticuerpos humanos recombinantes.

000120

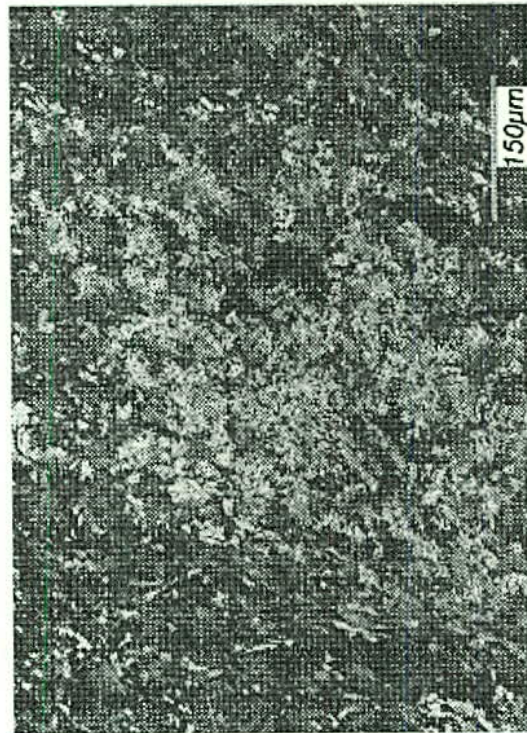
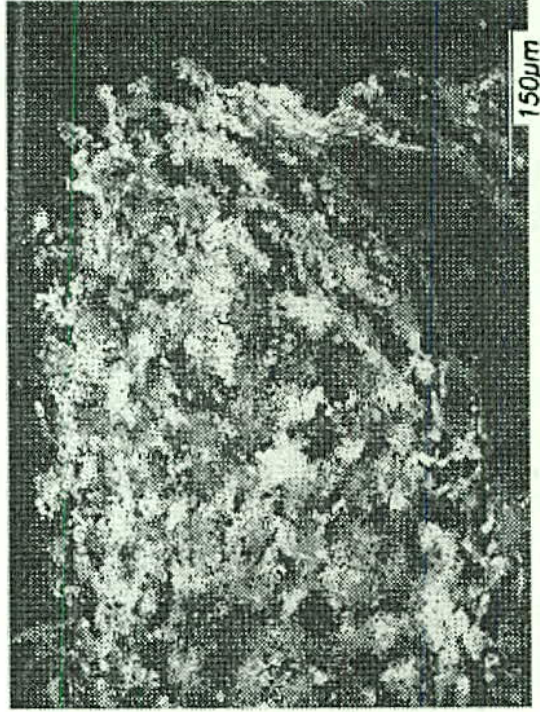
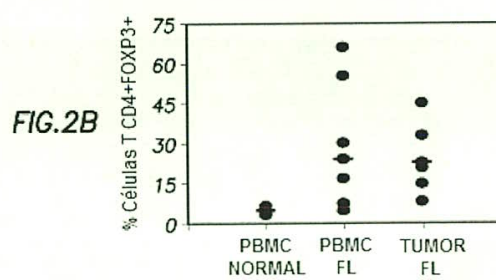
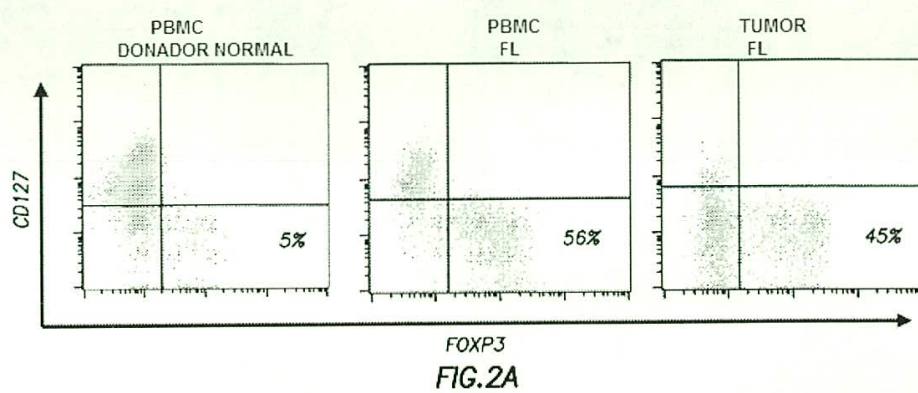


FIG.1

000121



000123

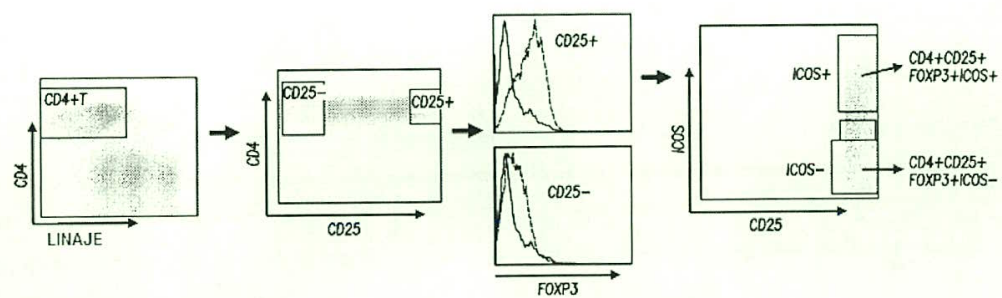


FIG.3

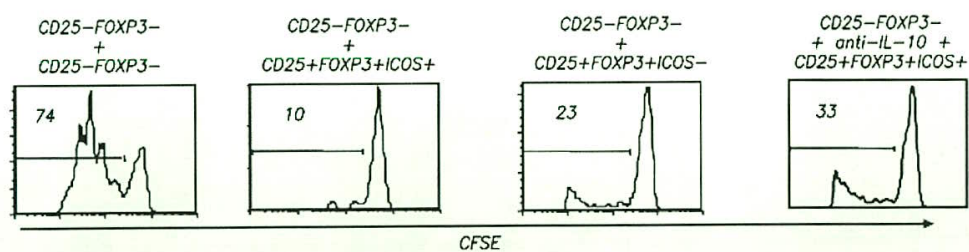


FIG.4

000124

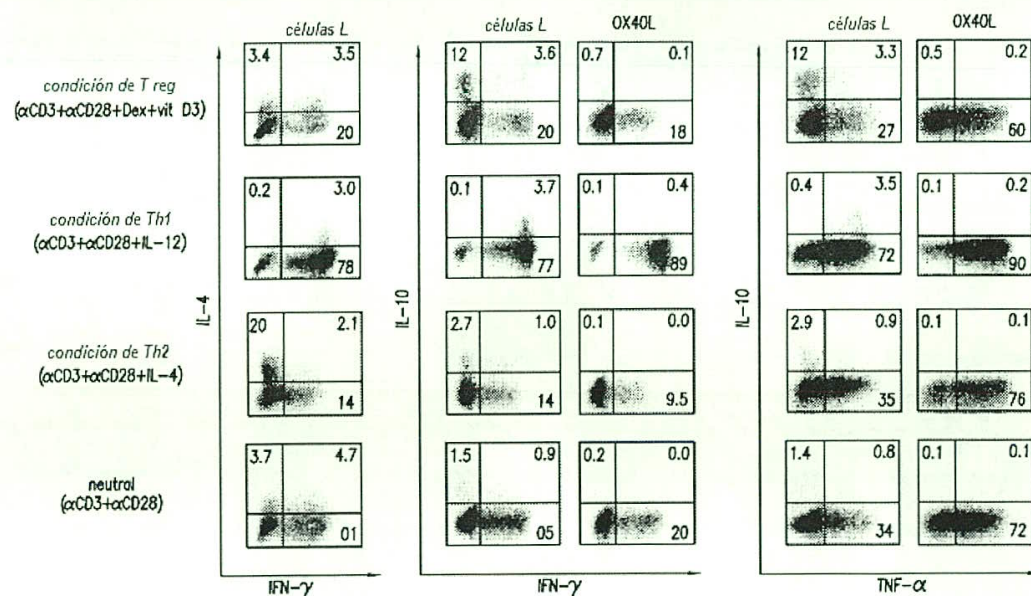


FIG.5A

000125

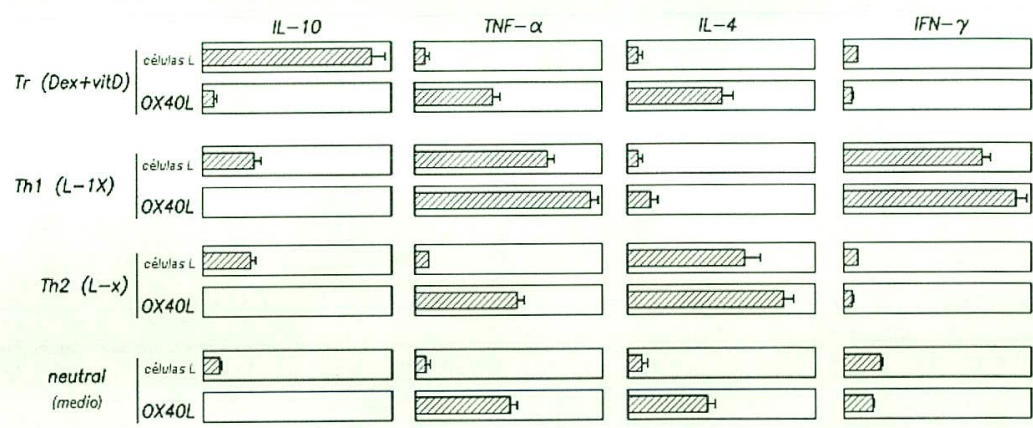


FIG.5B

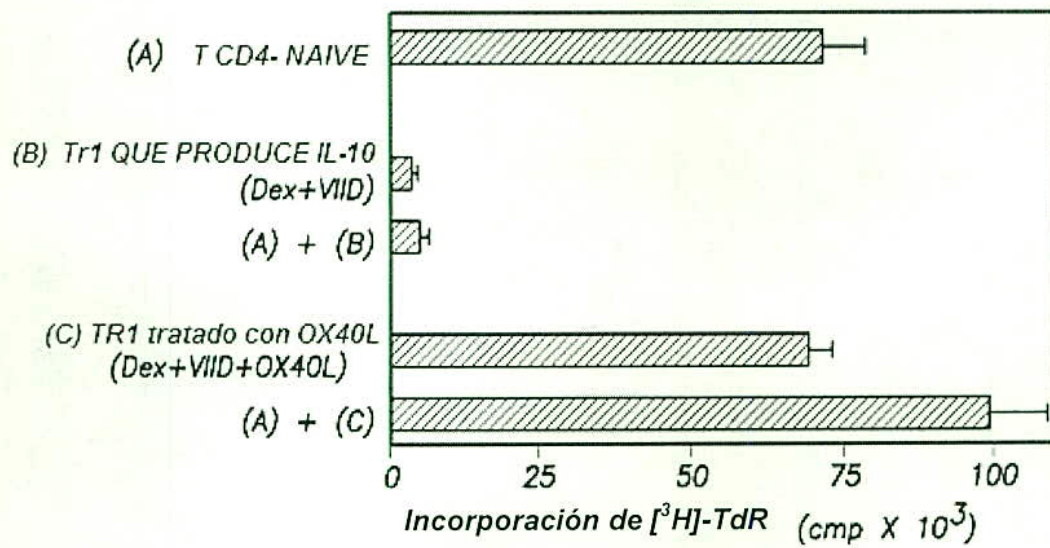


FIG.5C

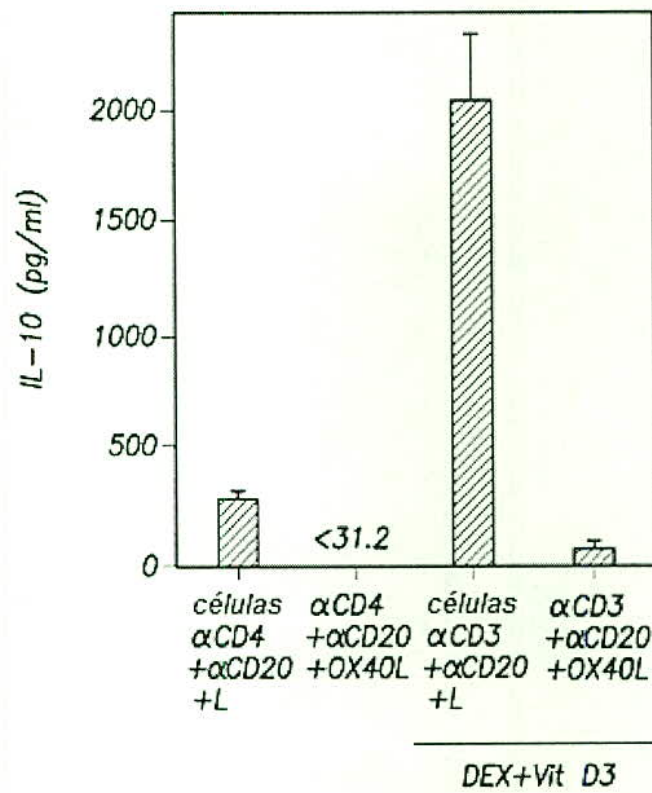
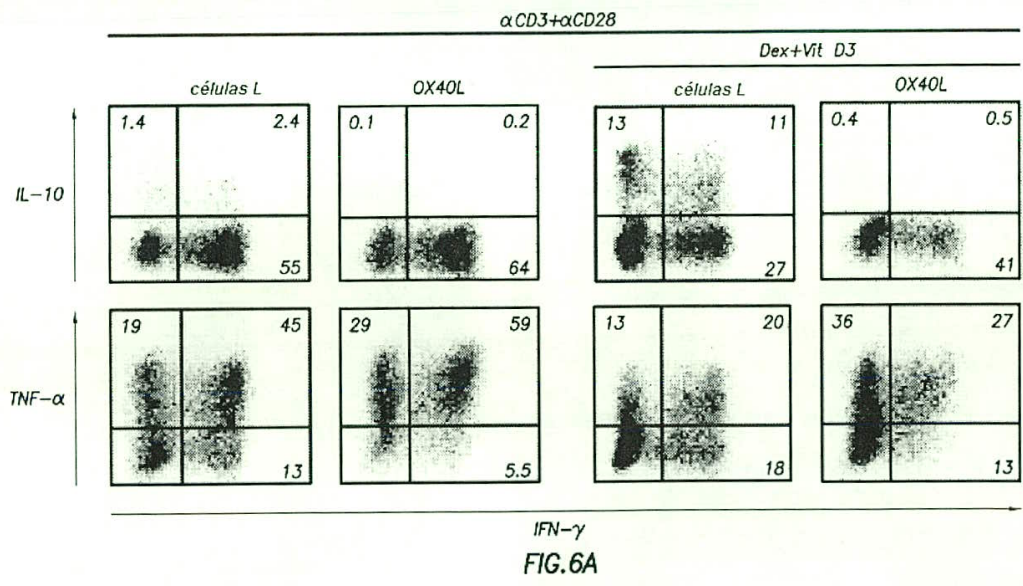
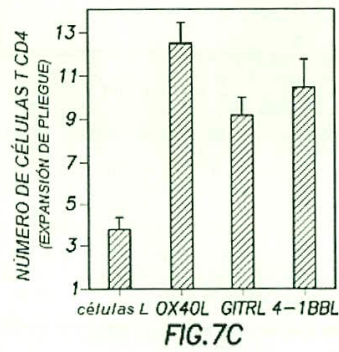
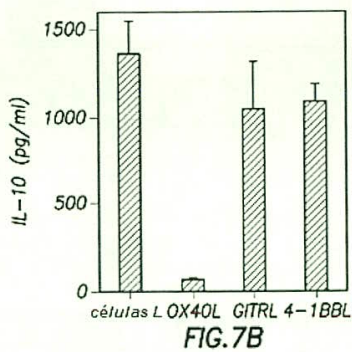
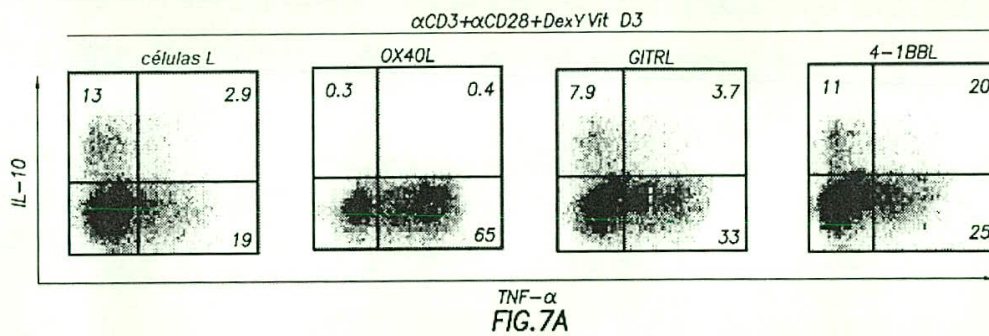


FIG.6B

000128



000129



000130

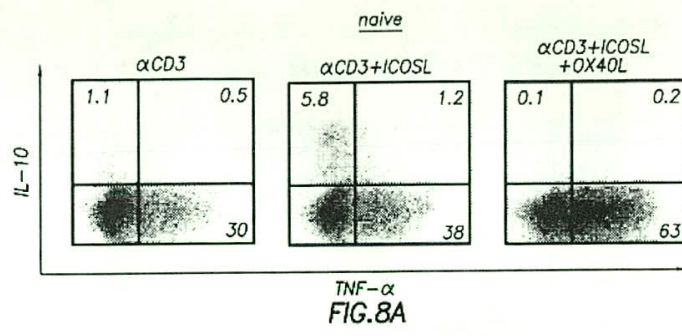


FIG.8A

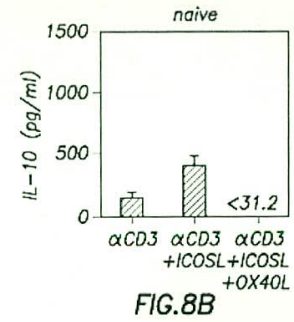


FIG.8B

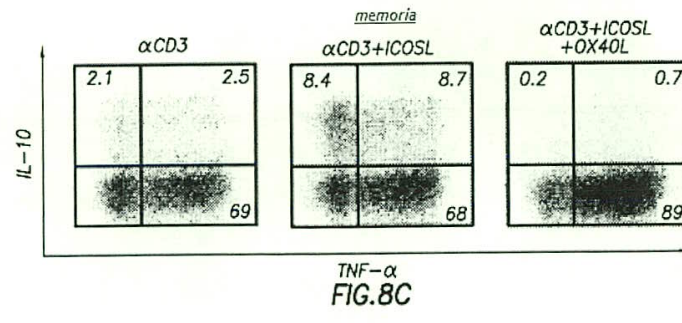


FIG.8C

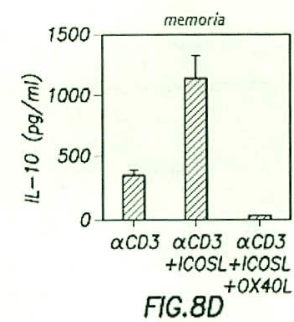


FIG.8D

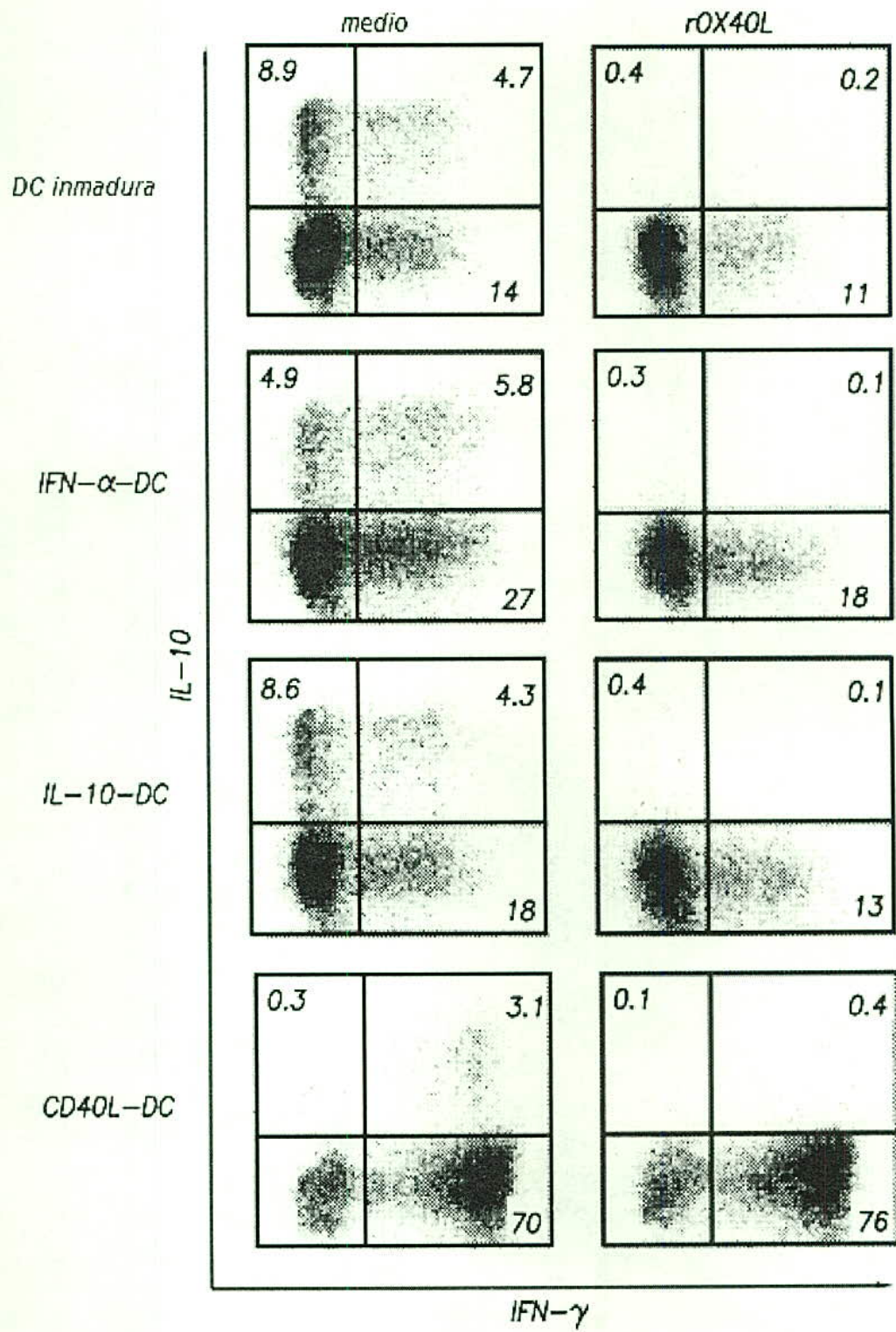


FIG.8E

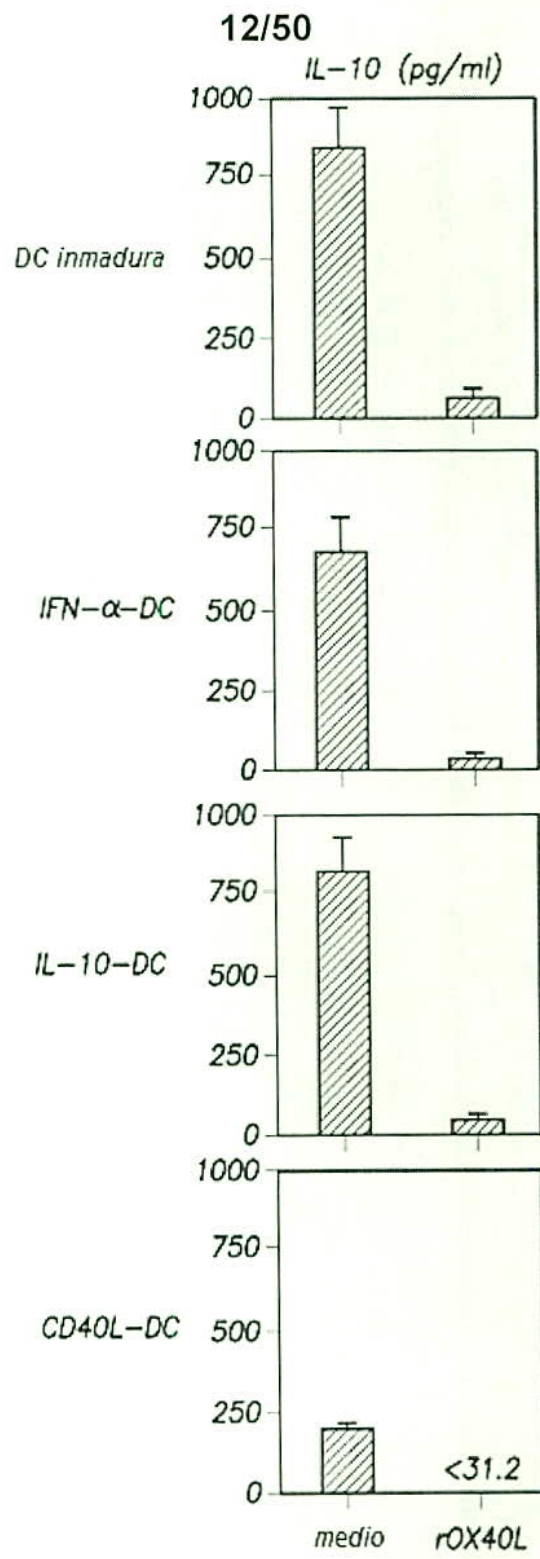


FIG.8F

000132

000133

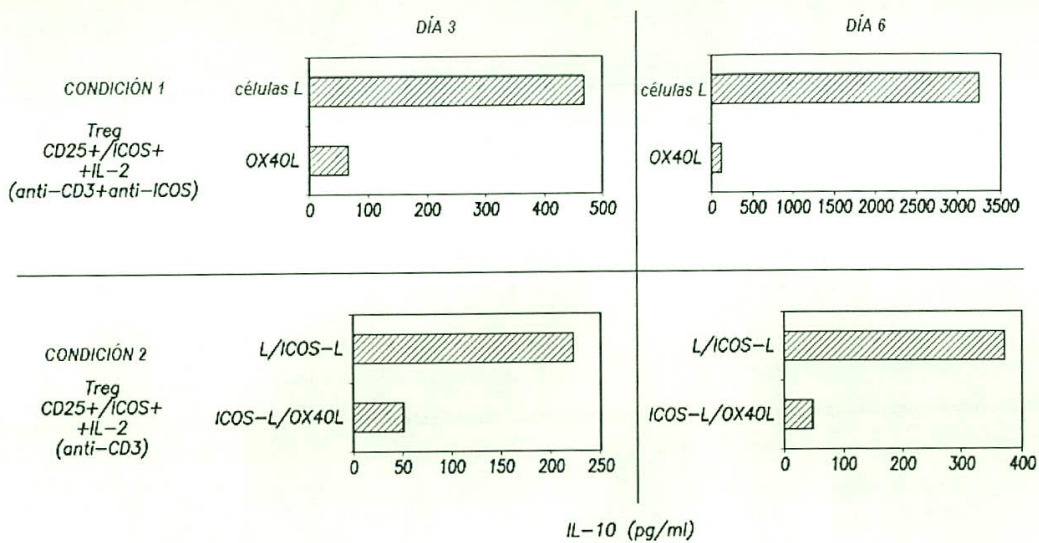


FIG.9

000134

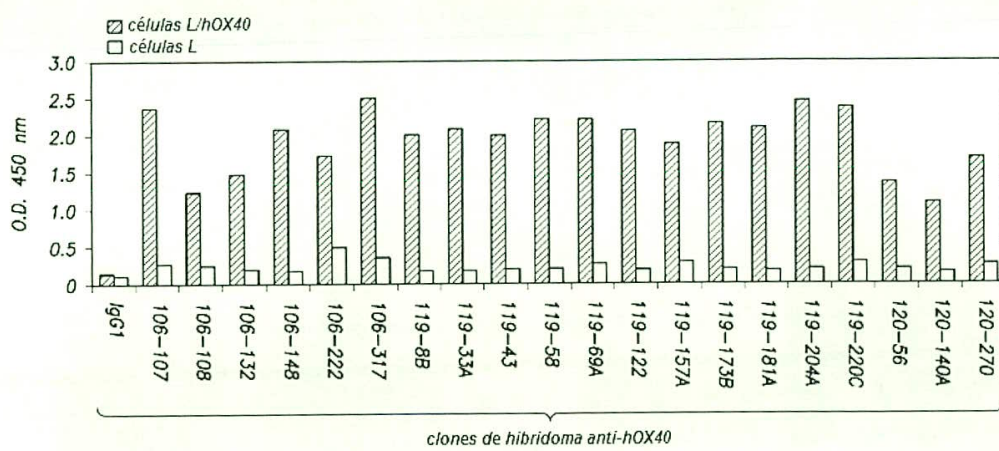


FIG.10

000135

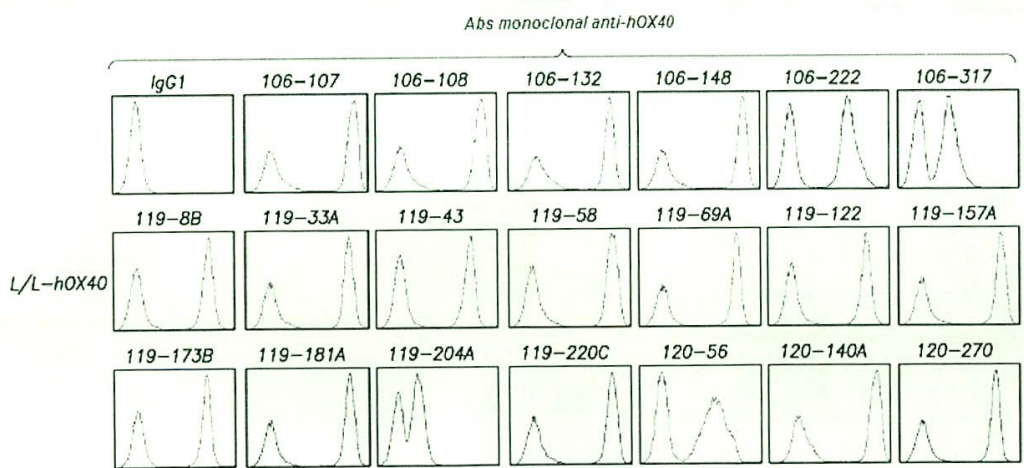


FIG.11

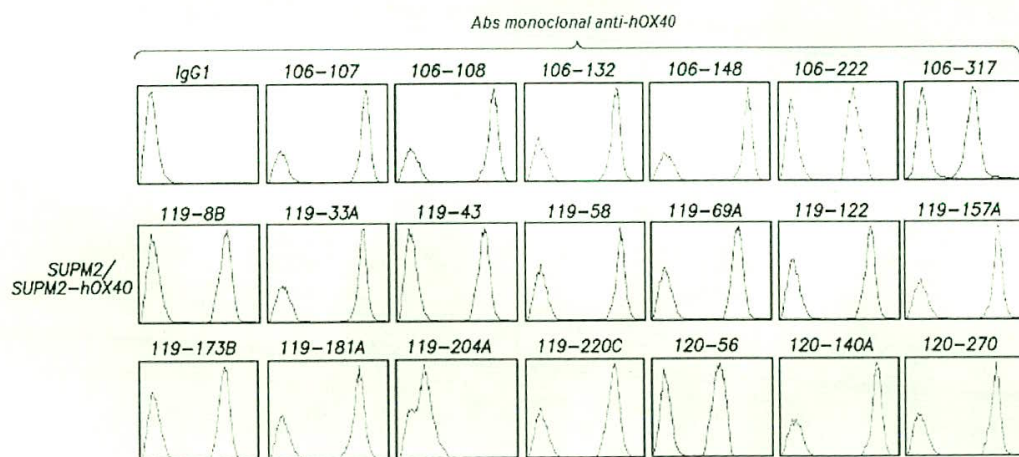


FIG.12

000137

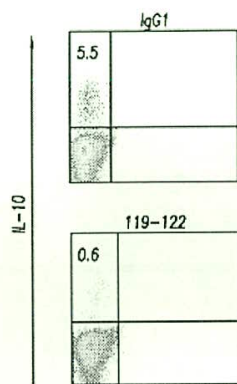
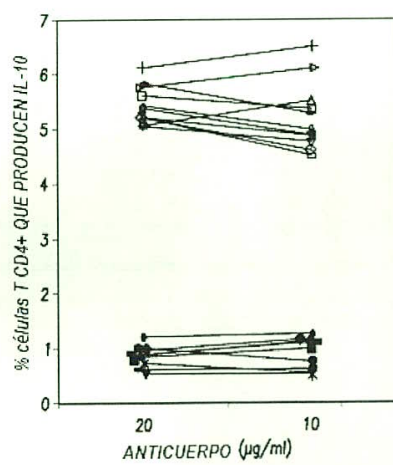


FIG. 13A

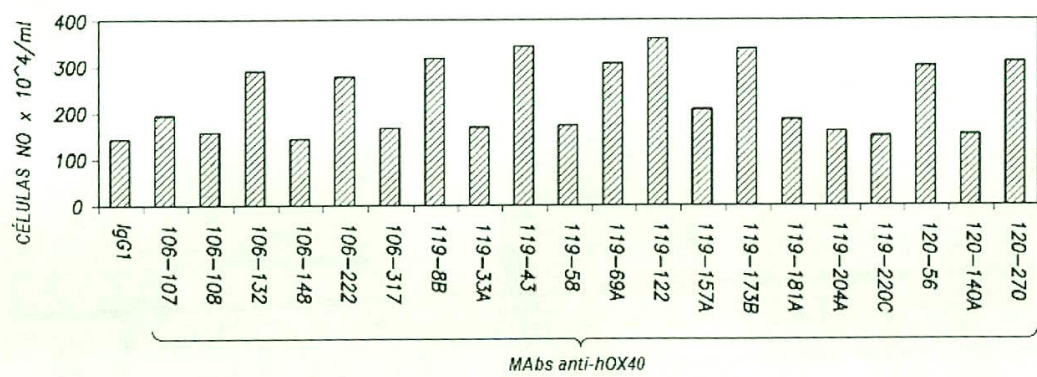


- IgG1
- 106-107
- △ 106-108
- ◇ 119-220C
- ◆ 106-148
- 106-317
- ▢ 119-33A
- ▽ 119-58
- × 119-157A
- ◊ 119-181A
- † 119-204A
- ▷ 120-140A
- 106-222
- * 119-122
- 119-173B
- ◆ 120-56
- ▲ 120-270
- ◆ 106-132
- ▽ 119-88
- 119-43
- 119-69A

Abs OX40 QUE NO
INHIBEN LA
GENERACIÓN DE
CÉLULAS Tr1 QUE
PRODUCEN IL-10

Abs OX40
QUE INHIBEN
LA GENERACIÓN
DE CÉLULAS
Tr1

FIG. 13B



MAbs anti-hOX40

FIG.14

000138

000139

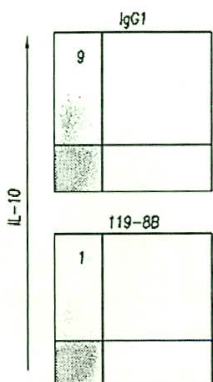


FIG.15A

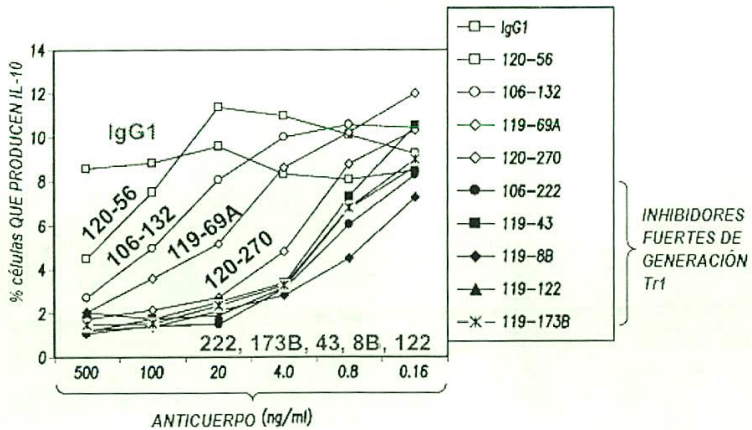


FIG.15B

000140

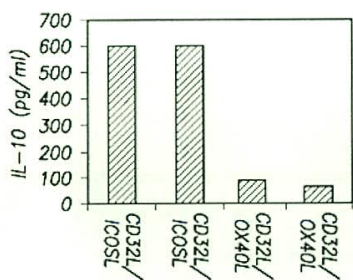


FIG.16A

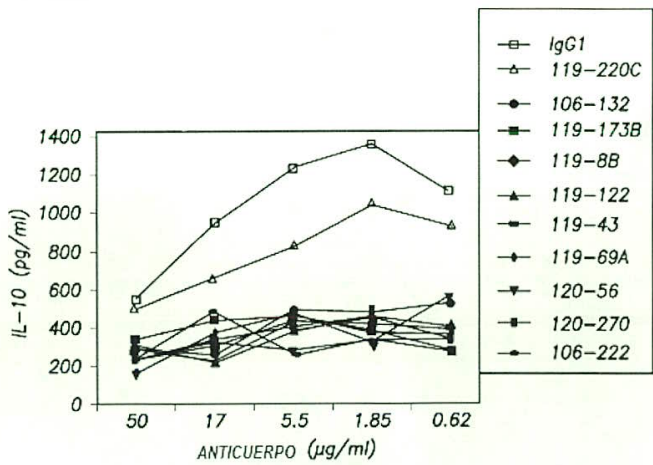
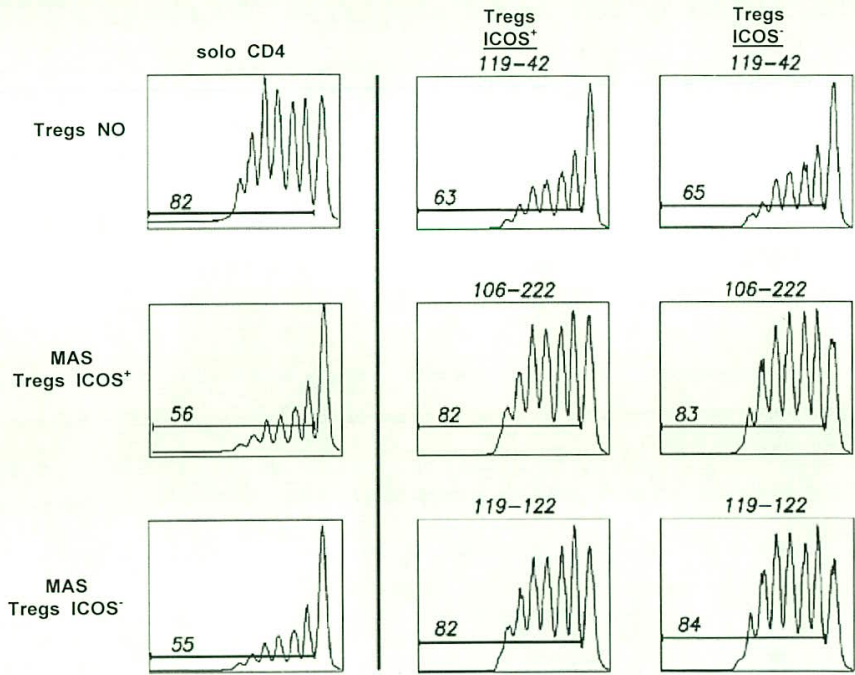


FIG.16B

FIG.16C



000141

000142

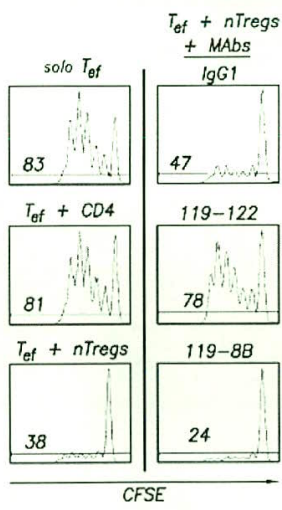


FIG.17A

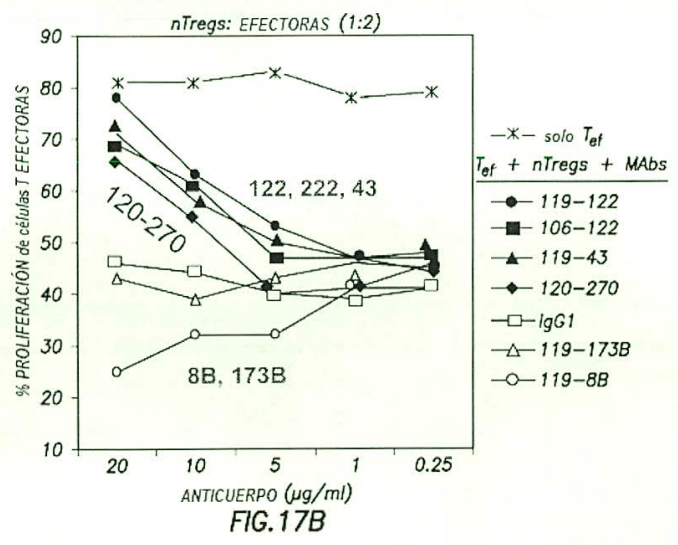


FIG.17B

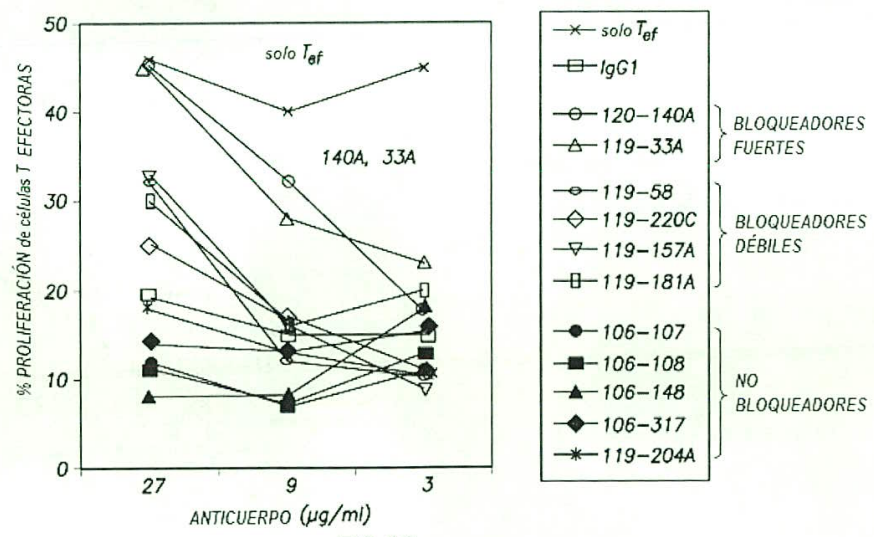


FIG. 18

000143

000144

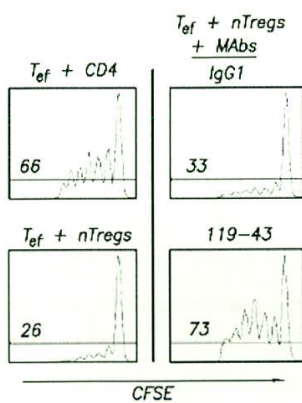


FIG.19A

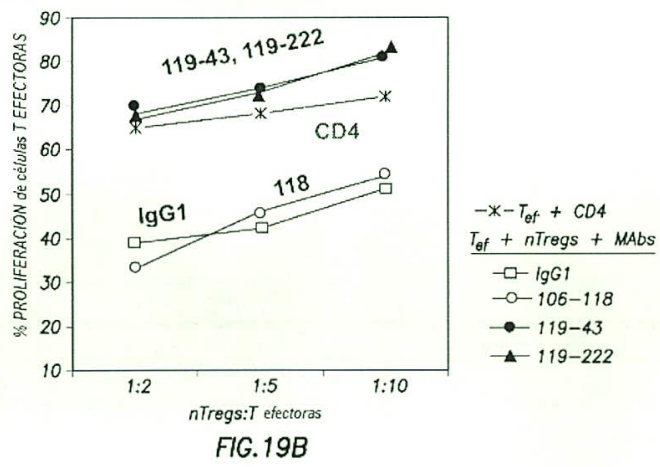


FIG.19B

000145

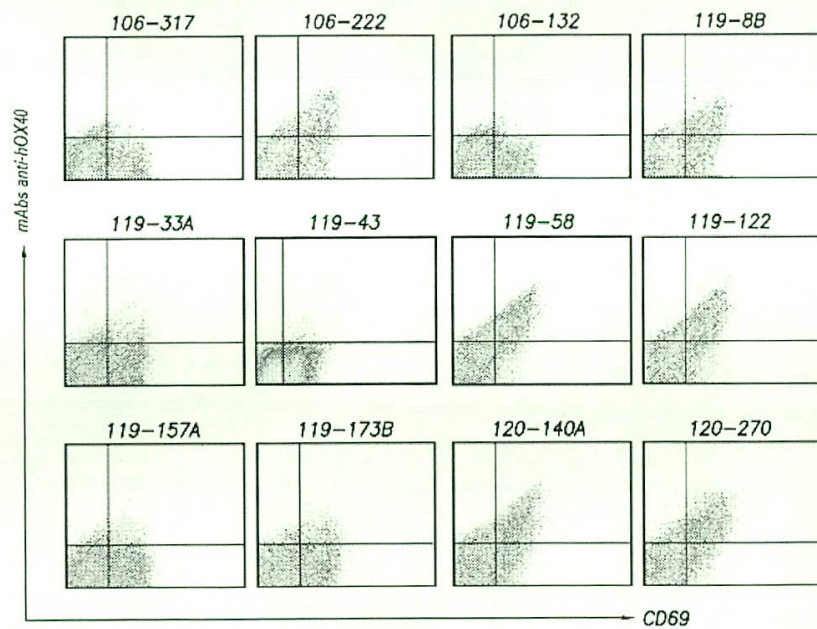
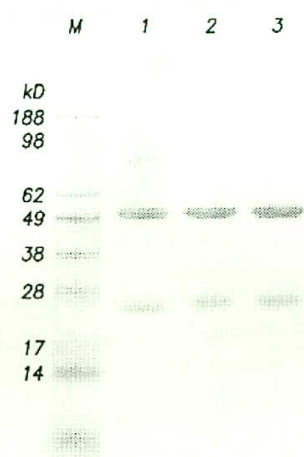


FIG.20



M: MARCADOES M.W.
1: 106-222 de Ratón
2: Hu106 Lote I Clon 222
3: Hu106 Lote II

FIG.21

000146

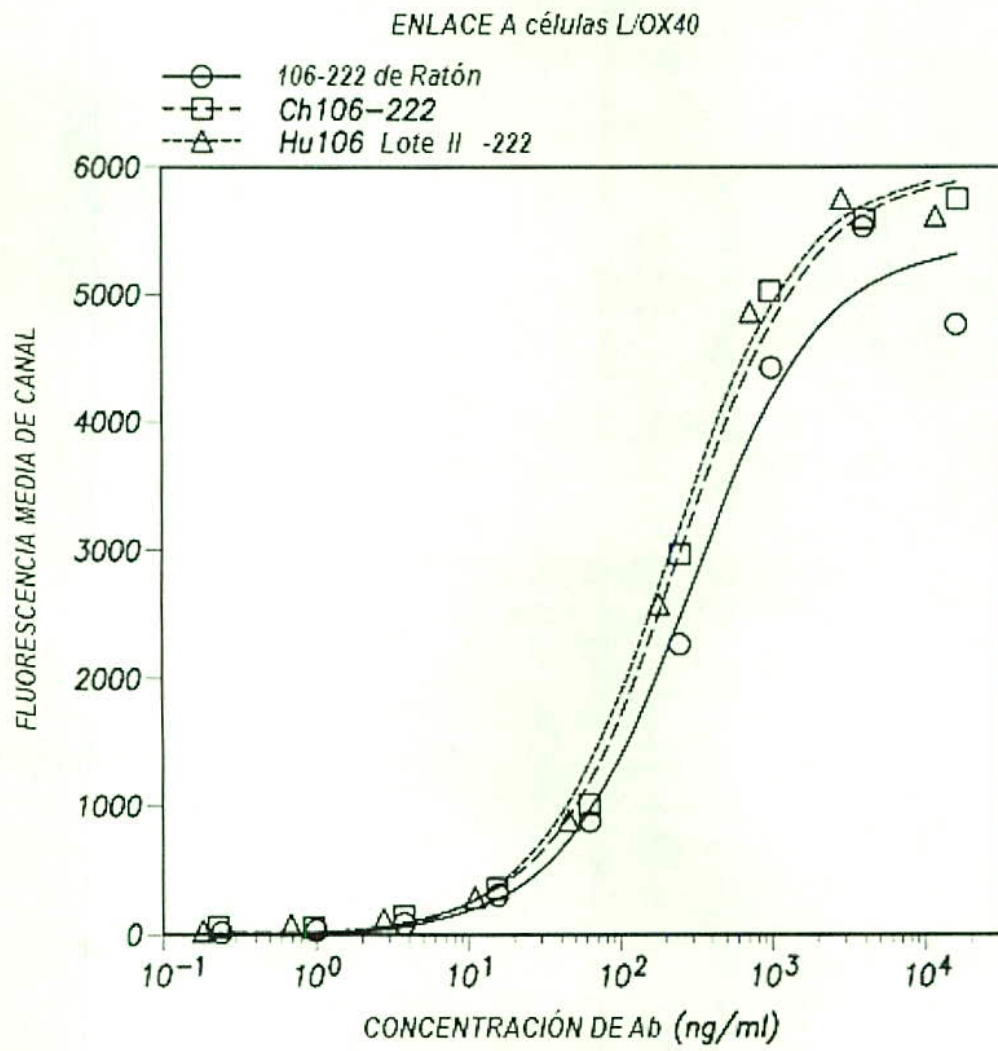


FIG.22

000147

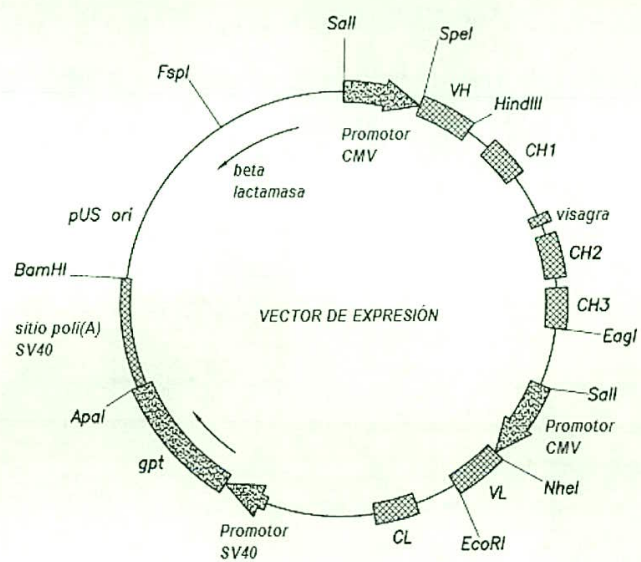


FIG.23

ENLACE A células L'OX40

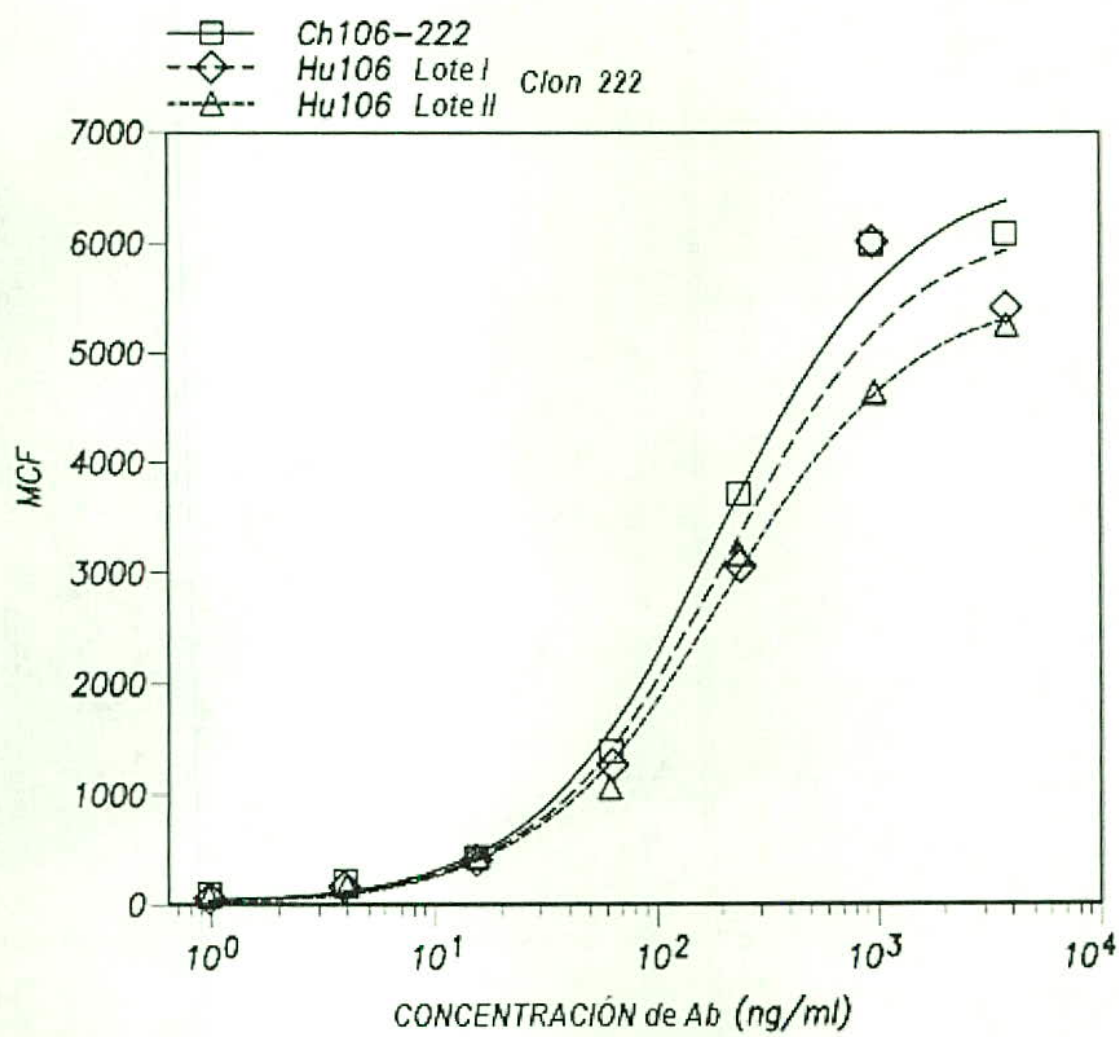


FIG.24

000149

000150

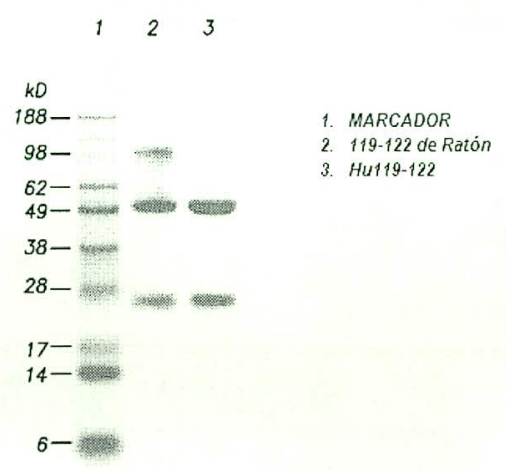


FIG.25

30/50

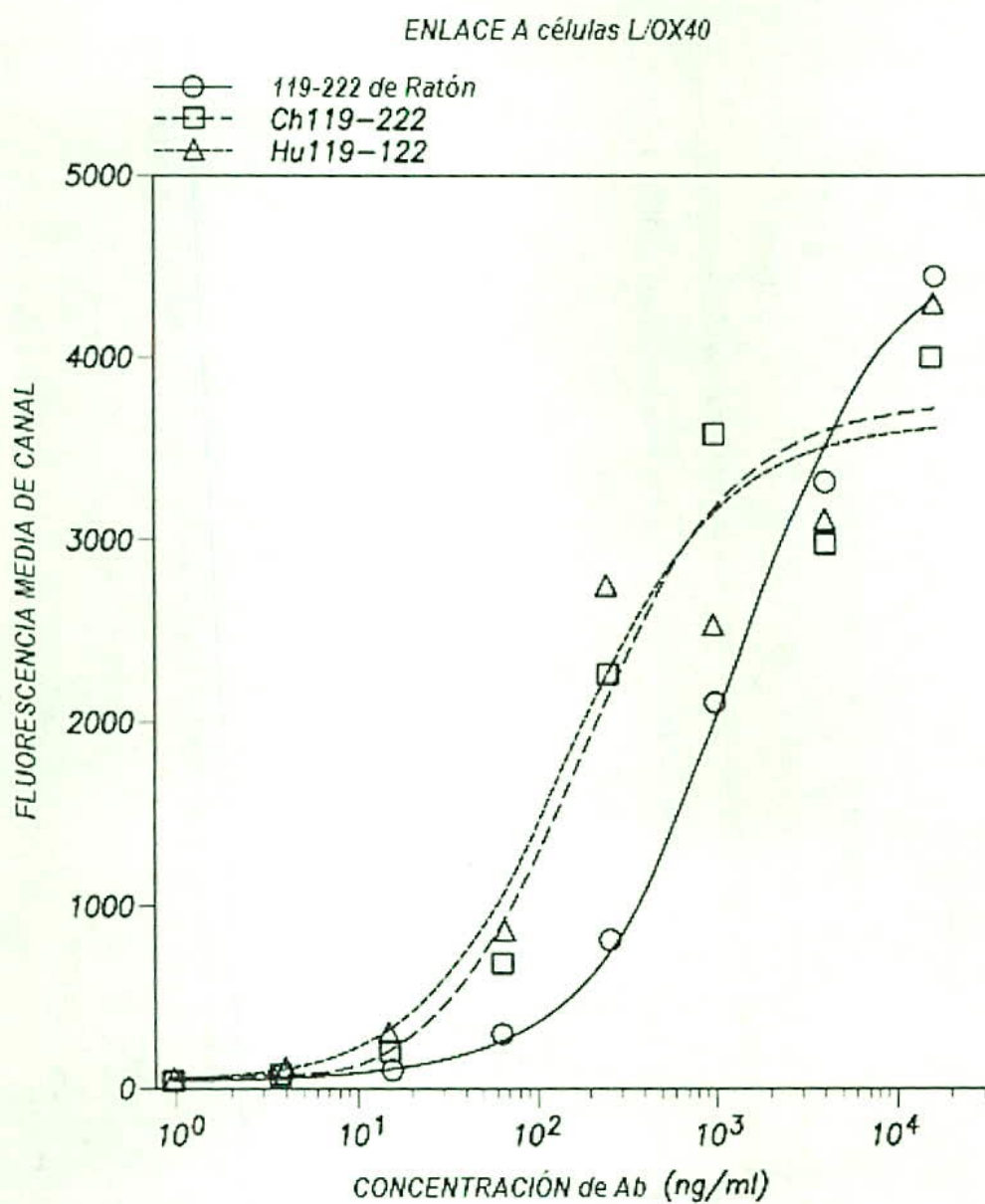


FIG.26

000151

000152

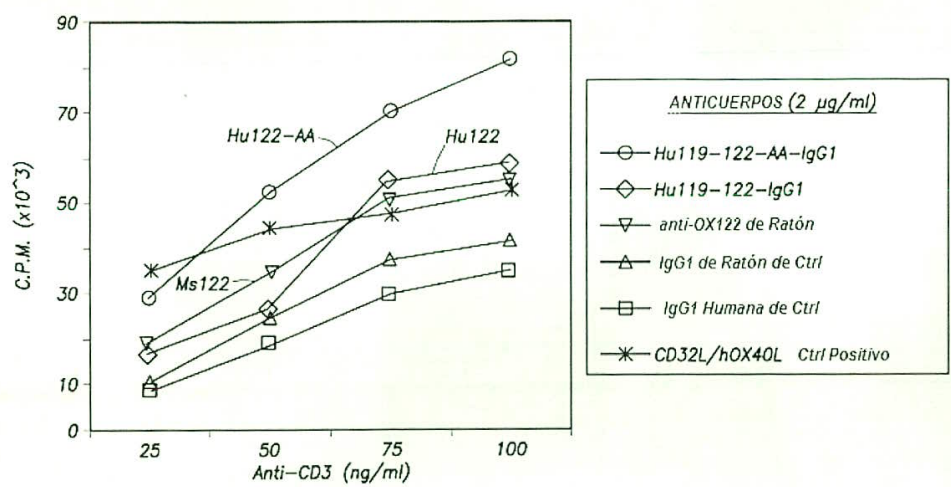


FIG.27

SISTEMA DE células L

000153

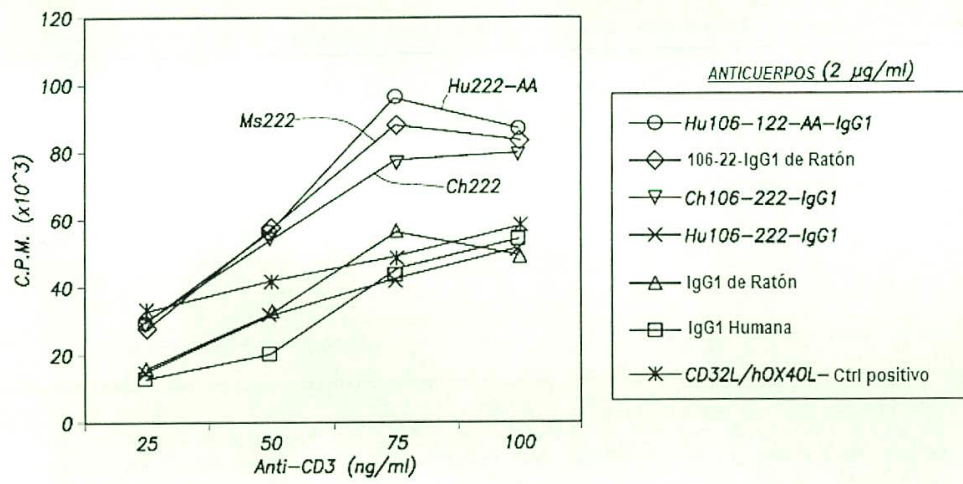


FIG.28

SISTEMA de células L

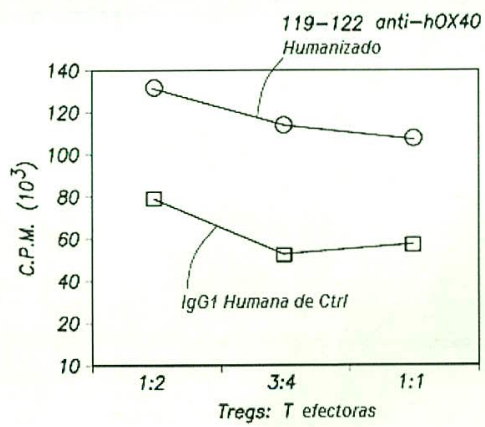


FIG.29A

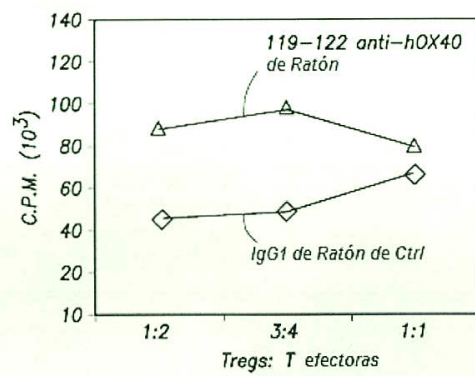


FIG.29B

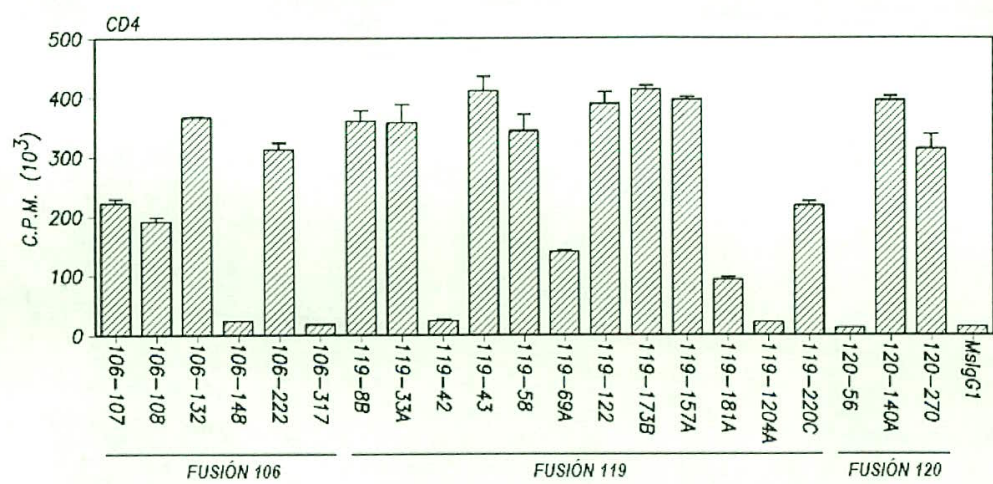


FIG.30A

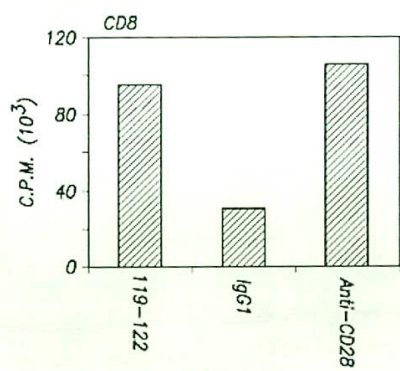


FIG.30B

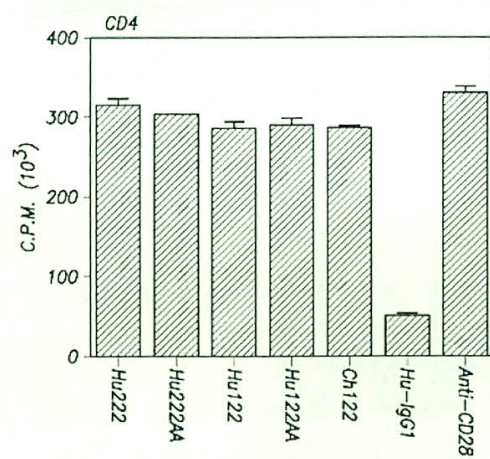


FIG.30C

000156

000157

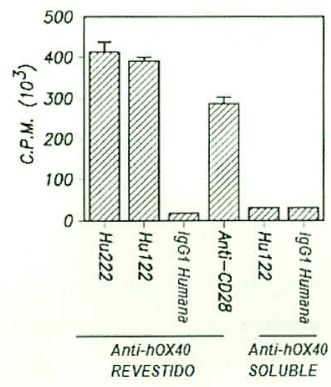


FIG.31A

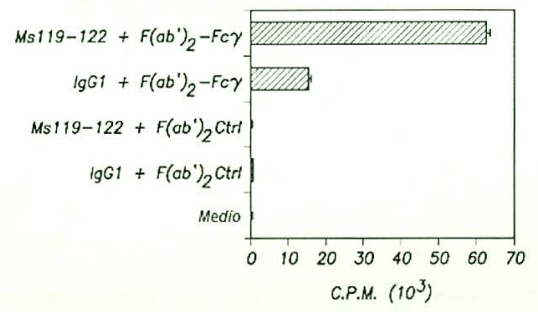


FIG.31B

000158



FIG.32A

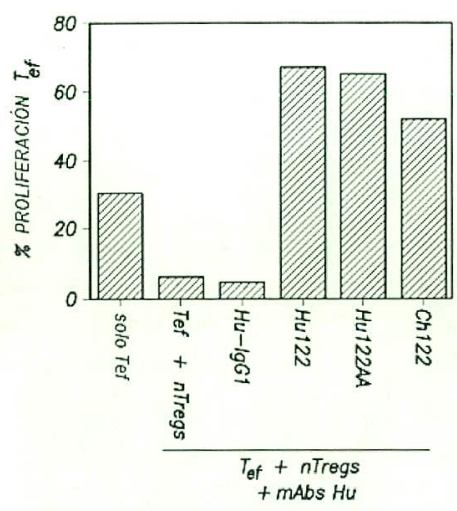
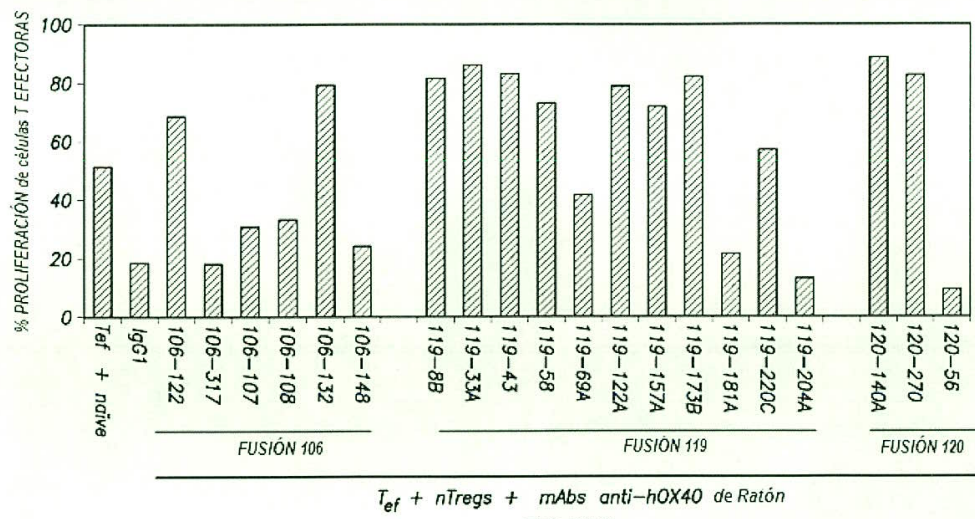


FIG.32C

000159



T_{ef} + nTregs + mAbs anti-hOX40 de Ratón

FIG.32B

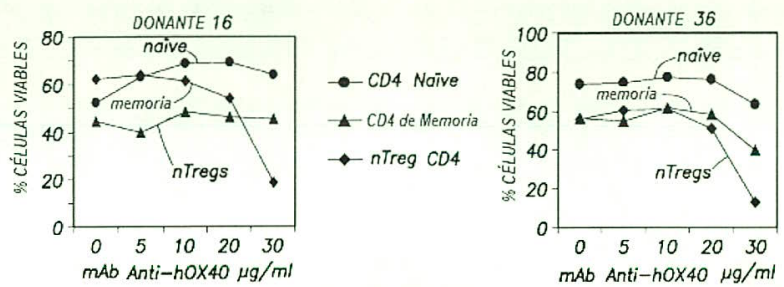
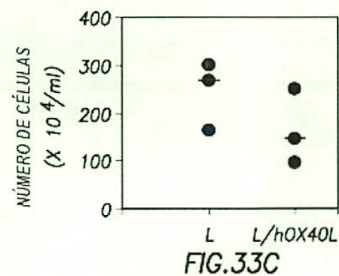
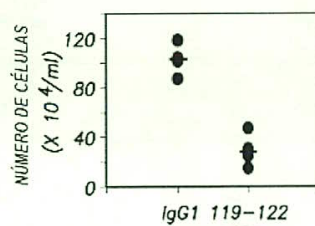


FIG.33A



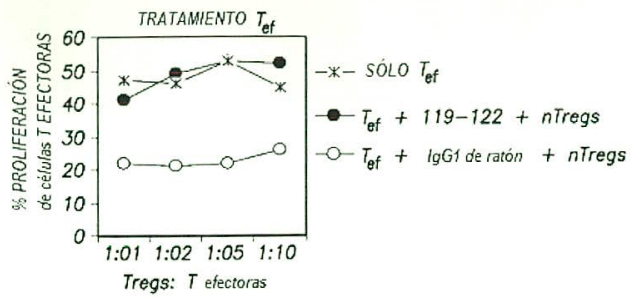


FIG.34A

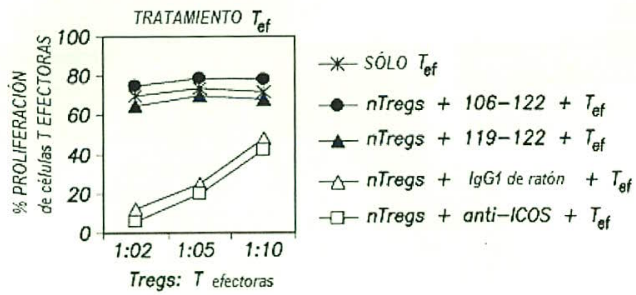


FIG.34B

000161

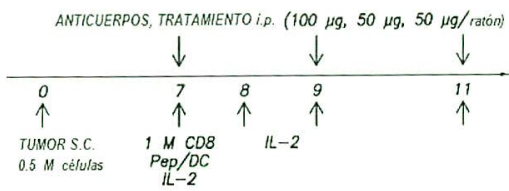


FIG.35A



FIG.35B

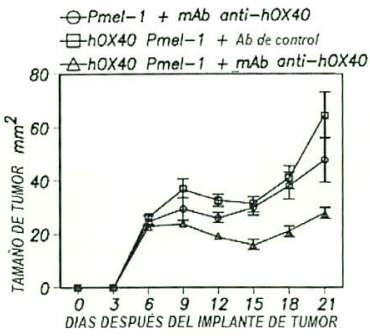


FIG.35C

000162

VH de 106-222

SEC ID No.4	VH de 106-222	1	2	3	
SEC ID No.5	VH de Hu106	123456789	0123456789	0123456789	0123456789
	X61012	QIQLVQSGP	ELKKPGETVK	ISCKASGYTF	TDYSMHVVKQ
		QVQLVQSGS	ELKKPGASVK	VSCKASGYTF	TDYSMHVVRQ
		QVQLVQSGS	ELKKPGASVK	VSCKASGYTF	T-----WVRQ
		4	5	6	7
		0123456789	01223456789	0123456789	0123456789
			a	CDR2	SEC ID No.2
	VH de 106-222	APGKGLKWMG	WINTETGEPTY	ADDFKGRFAF	SLETSASTAY
	VH de Hu106	APGQGLKWMG	WINTETGEPTY	ADDFKGRFVF	SLDTSVSTAY
	X61012	APGQGLEWMG	-----	-----RFVF	SLDTSVSTAY
		8	9	1	1
		0122223456789	0123456789	000000123456789	0123
		abc		abcde	CDR3
	VH de 106-222	LQINNLKNETAT	YFCANPYDY	VSYYAMDY	WGHGTSV
	VH de Hu106	LQISSLKAEDTAV	YYCANPYDY	VSYYAMDY	WQGTTV
	X61012	LQISSLKAEDTAV	YYCAR-----	-----	WKGTTV

FIG.36

000163

000162

	VL de 106-222				CDR1 SEC ID No.7
		1	2	3	
SEC ID No.10	VL de 106-222	123456789	0123456789	0123456789	0123456789
SEC ID No.11	VL de Hu106	DIVMTQSHK	FMSTSVRDRV	SITCKASQDV	STAVAWYQQK
	AJ388641	DIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCKASQDV	STAVAWYQQK
		DIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITC-----	-----WYQQK
				CDR2 SEC ID No.8	
		4	5	6	7
VL de 106-222		0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
VL de Hu106		PGQSPKLLIY	SASYLYTGVP	DRFTGSGSGT	DFTFTISSVQ
AJ388641		PGKAPKLLIY	SASYLYTGVP	SRFSGSGSGT	DFTFTISSLQ
		PGKAPKLLIY	-----GVP	SRFSGSGSGT	DFTFTISSLQ
		CDR3 SEC ID No.9			
		8	9	1	0
VL de 106-222		0123456789	0123456789	01234567	
VL de Hu106		AEDLAVYYCQ	QHYSTPRTFG	GGTKLEIK	
AJ388641		PEDIATYYCQ	QHYSTPRTFG	QGTKLEIK	
		PEDIATYYC-	-----FG	QGTKLEIK	

44/50

FIG.37

VH de Hu106-222
SpeI
SEC ID No. 6 ACTAGTACCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTATTCCTGATGGCAGCTGCCCAAAGT
M A W V W T L L F L M A A A Q S
ATCCAAGCACAGGTTTCAGTTGGTGCAGTCTGGATCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGCCTCA
I Q A Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S
GTCAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGTTATACCTTCACAGACTATTCAATGCACTGGGTG
V K V S C K A S G Y T F T D Y S M H W V
CGACAGGCTCCAGGACAAGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACTGAGACTGGTGAG
R Q A P G Q G L K W M G W I N T E T G E
CCAACATATGCAGATGACTTCAAGGACGGTTTGTCTTCTTTGGACACCTCTGTCAGC
P T Y A D D F K G R F V F S L D T S V S
ACTGCCTATTTGCAGATCAGCAGCCTCAAAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCT
T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A
AATCCCTACTATGATTACGTCTCTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACCACG
N P Y Y D Y V S Y Y A M D Y W G Q G T T
HindIII
GTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTCAAGCTT
V T V S S

FIG.38

000165

VL de Hu106-222
NheI
SEC ID NO. 12 GCTAGCACCACCATGGAGTCACAGATTCAGGTCTTTGTATTTCGTGTTTCTCTGGTTGTCT
M E S Q I Q V F V F V F L W L S

GGTGTGACGGAGACATTGAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCCGCATCAGTGGGA
G V D G D I Q M T Q S P S S L S A S V G

GACAGGGTCACCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTAT
D R V T I T C K A S Q D V S T A V A W Y

CAACAGAAACCAGGAAAAGCCCTAACTACTGATTTACTCGGCATCCTACCTCTACACT
Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y L Y T

GGAGTCCCTTCACGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACTTTCACCATCAGC
G V P S R F S G S G S G T D F T F T I S

AGTCTGCAGCCTGAAGACATTGCAACATATTACTGTCAGCAACATTATAGTACTCCTCGG
S L Q P E D I A T Y Y C Q Q H Y S T P R

ACGTTCGGTCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGTAAGTAGAATCCAAAGAAATTC
EcoRI
T F G Q G T K L E I K

FIG.39

00166

000167

VH de 119-122

SEC ID No.16	VH de 119-122	1	2	3	
SEC ID No.17	VH de Hu119	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
	Z14189	EVQLVESGG	GLVQPGESLK	LSCESNEYEF	PSHDMSWVRK
		EVQLVESGG	GLVQPGGSLR	LSCAASEYEF	PSHDMSWVRQ
		EVQLVESGG	GLVQPGGSLR	LSCAASGFTF	S-----WVRQ

VH de 119-122

		4	5	6	7
		0123456789	01223456789	0123456789	0123456789
			a		
		TPEKRLELVA	AINSDGGSTYY	PDTMERRFII	SRDNTKKTLY
		APGKGLELVA	AINSDGGSTYY	PDTMERRFTI	SRDNAKNSLY
		APGKGLEWVA	-----	-----RFTI	SRDNAKNSLY

VH de 119-122

		8	9	1	1
		0122223456789	0123456789	0000123456789	0123
		abc	abc		
		LQMSSLRSEDAL	YYCARHYDDY	YAWFAYWGQGLV	TVSA
		LQMNSLRAEDTAV	YYCARHYDDY	YAWFAYWGQGMV	TVSS
		LQMNSLRAEDTAV	YYCAR-----	-----WGQGMV	TVSS

VH de Hu119

Z14189

FIG.40

VL de 119-122

			1	2	3	
			123456789	0123456789	01234567777789	0123456789
					abcd	CDR1 SEC ID No.19
SEC ID No.22	VL de 119-122		DIVLTQSPA	SLAVSLGQRA	TISCRASKSVSTSG	YSYMHWYQQK
SEC ID No.23	VL de Hu119		EIVLTQSPA	TLSLSPGERA	TLSCRASKSVSTSG	YSYMHWYQQK
	M29469		EIVLTQSPA	TLSLSPGERA	TLSC-----	-----WYQQK
					CDR2 SEC ID No.20	
			4	5	6	7
			0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
	VL de 119-122		PGQPPKLLIY	LASNLESGVP	ARFSGSGSGT	DFTLNIHPVE
	VL de Hu119		PGQAPRLLIY	LASNLESGVP	ARFSGSGSGT	DFTLTISSLE
	M29469		PGQAPRLLIY	-----GVP	ARFSGSGSGT	DFTLTISSLE
			CDR3 SEC ID No.21			
					1	
			8	9	0	
			0123456789	0123456789	01234567	
	VL de 119-122		EEDAATYYCQ	HSRELPLTFG	AGTKLELK	
	VL de Hu119		PEDFAVYYCQ	HSRELPLTFG	GGTKVEIK	
	M29469		PEDFAVYYC-	-----FG	GGTKVEIK	

48/50

FIG.41

000153

000169

VH de Hu119-122
SpeI
SEC ID No. 18 ACTAGTACCACCATGGACTTCGGGCTCAGCTTGGTTTTCTTGTCCTTATTTTAAAAAGT
M D F G L S L V F L V L I L K S

GTACAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCC
V Q C E V Q L V E S G G G L V Q P G G S

CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGAATACGAGTTCCTTCCCATGACATGTCTTGGGTC
L R L S C A A S E Y E F P S H D M S W V

CGCCAGGCTCCGGGAAGGGGCTGGAGTTGGTCGCAGCCATTAATAGTGATGGTGGTAGC
R Q A P G K G L E L V A A I N S D G G S

ACCTACTATCCAGACACCATGGAGAGACGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC
T Y Y P D T M E R R F T I S R D N A K N

TCACTGTACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCA
S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A

AGACACTATGATGATTACTACGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGAATATGGTCACT
R H Y D D Y Y A W F A Y W G Q G T M V T

HindIII
GTCTCTTCAGGTGAGTCCTAACTTCAAGCTT
V S S

FIG.42

000170

VL de 119-122
NheI
SEC ID No. 24 GCTAGCACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCA
M E T D T L L L W V L L L W V P

GGTTCCACTGGTGAAATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTACCTTATCTTTGTCTCCAGGG
G S T G E I V L T Q S P A T L S L S P G

GAAAGGGCCACCCTCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGTACATCTGGCTATAGTTAT
E R A T L S C R A S K S V S T S G Y S Y

ATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGGCTCCCAGACTCCTCATCTATCTTGCATCC
M H W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y L A S

AACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACC
N L E S G V P A R F S G S G S G T D F T

CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAGGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCACAGTAGG
L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q H S R

GAGCTTCCGCTCACGTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTCGAGATCAAAC GTAAGTACACTTTT
E L P L T F G G G T K V E I K

EcoRI
CTGAATTC

FIG.43

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

<120> ANTICUERPOS ANTI-OX40 Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

<130> UTFC.P1193WO

<140>

<141>

<150> 61/380,827

<151> 2010-09-08

<150> 61/375,999

<151> 2010-08-23

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 1

Asp Tyr Ser Met His

1

5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 3

Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1

5

10

<210> 4

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 4

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

1

5

10

15

000171

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly His Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 5

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

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

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp

000172

100

105

110

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

<210> 6

<211> 458

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 6

actagtagcac ccatggcctt ggtgtggacc ttgctattcc tgatggcagc tgcccaaagt
60atccaagcac aggttcagtt ggtgcagtct ggatctgagc tgaagaagcc tggagcctca
120gtcaagggtt cctgcaaggc ttctgggttat accttcacag actattcaat gcaactgggtg
180cgacaggctc caggacaagg tttaaagtgg atgggctgga taaacactga gactgggtgag
240ccaacatatg cagatgactt caagggacgg tttgtcttct ctttggacac ctctgtcagc
300actgcctatt tgcagatcag cagcctcaaa gctgaggaca cggctgtgta ttactgtgct
360aatccctact atgattacgt ctcttactat gctatggact actgggggtca gggaaccacg
420gtcaccgtct cctcaggtaa gaatggcctc tcaagctt
458

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 7

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

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 8

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr
1 5

<210> 9

<211> 9

000173

<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 9
Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
1 5

<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 10
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético

<400> 11
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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

000174

50

55

60

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

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

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

<210> 12

<211> 416

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 12

gctagcacca ccatggagtc acagattcag gtctttgtat tcgtgtttct ctggttggtct
60

ggtgttgacg gagacattca gatgaccag tctccatcct ccctgtccgc atcagtggga
120

gacaggggtca ccatcacctg caaggccagt caggatgtga gtactgctgt agcctgggtat
180

caacagaaac caggaaaagc ccctaaacta ctgatttact cggcatccta cctctacact
240

ggagtcctt cagcgttcag tggcagtga tctgggacgg atttcacttt caccatcagc
300

agtctgcagc ctgaagacat tgcaacatat tactgtcagc aacattatag tactcctcgg
360

acgttcggtc agggcaccaa gctggaaatc aaacgtaagt agaatccaaa gaattc
416

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 13

Ser His Asp Met Ser
1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 14

Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Glu

000175

1 5 10 15

Arg

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 15
His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 16
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ser Asn Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 17
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético

000176

<400> 17

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 Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30

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

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

Glu Arg 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 Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18

<211> 451

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 18

actagtaccca ccatggactt cgggctcagc ttggttttcc ttgtccttat tttaaaaagt
60

gtacagtgtg aggtgcagct ggtggagtct gggggaggct tagtgcagcc tggagggtcc
120

ctgagactct cctgtgcagc ctctgaatac gagttccctt cccatgacat gtcttggtgc
180

cgccaggctc cggggaaggg gctggagttg gtcgcagcca ttaatagtga tgggtggtagc
240

acctactatc cagacaccat ggagagacga ttcaccatct ccagagacaa tgccaagaac
300

tcactgtacc tgcaaataaa cagtctgagg gccgaggaca cagccgtgta ttactgtgca
360

agacactatg atgattacta cgcctggttt gcttactggg gccaaaggac tatggtcact
420

000177

gtctcttcag
451

gtgagtccta

acttcaagct

t

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 19
Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 20
Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 21
Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 22
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 22
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

000178

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 23
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
 sintético

<400> 23
 Glu Ile Val Leu 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 Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 24
 <211> 428
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
 sintético

<400> 24
 gctagcacca ccatggagac agacacactc ctgttatggg tactgctgct ctggggtcca
 60

ggttcactg gtgaaattgt gctgacacag tctcctgcta ccttatcttt gtctccaggg
 120

gaaagggcca ccctctcatg cagggccagc aaaagtgtca gtacatctgg ctatagttat
 180

atgcactggg accaacagaa accaggacag gctcccagac tcctcatcta tcttgcaccc
 240

000170

aacctagaat ctgggggtccc tgccaggttc agtggcagtg ggtctgggac agacttcacc
300

ctcaccatca gcagcctaga gcctgaggat tttgcagttt attactgtca gcacagtagg
360

gagcttcgcg tcacgttcgg cggagggacc aaggtcgaga tcaaacgtaa gtacactttt
420

ctgaattc
428

000180

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 March 2012 (01.03.2012)

(10) International Publication Number
WO 2012/027328 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2011/048752

(22) International Filing Date:
23 August 2011 (23.08.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/375,999 23 August 2010 (23.08.2010) US
61/380,827 8 September 2010 (08.09.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US): BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM [US/US]; 201 West 7th Street, Austin, TX 78701 (US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): LIU, Yong-Jun [US/US]; 2623 West Bainbridge Circle, Pearland, TX 77584 (US). VOO, Kui Shin [MY/US]; 2207 Drake Falls, Pearland, TX 77584 (US). BOVER, Laura [AR/US]; 4522 Brookren Court, Pearland, TX 77584 (US). TSURUSHITA, Nanya [JP/US]; 3719 Redwood Circle, Palo Alto, CA 94306 (US). TSO, J. Yun [US/US]; 445 Oak Grove Avenue #16, Menlo Park, CA 94025 (US). KUMAR, Shankar [US/US]; 3930 Kral Place, Pleasanton, CA 94588 (US).

(74) Agent: NIELSEN IP LAW LLC; Nielsen IP Law LLC, 1177 West Loop South, Suite 1600, Houston, TX 77027 (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, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))



WO 2012/027328 A2

(54) Title: ANTI-OX40 ANTIBODIES AND METHODS OF USING THE SAME

(57) Abstract: Human antibodies, preferably recombinant human antibodies, both humanized and chimeric, which specifically bind to human OX40 are disclosed. Preferred antibodies have high affinity for OX40 receptor and activate the receptor in vitro and in vivo. The antibody can be a full-length antibody or an antigen-binding portion thereof. The antibodies, or antibody portions, are useful for modulating receptor activity, e.g., in a human subject suffering from a disorder in which OX40 activity is detrimental. Nucleic acids, vectors and host cells for expressing the recombinant human antibodies are provided, and methods of synthesizing the recombinant human antibodies, are also provided.

000181

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Carrera 11 n° 86-53, Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 618 1088-Fax: (57 1) 6350824-E-mail:clarkemodet@clarkemodet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculta (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

Barry D. Burgdorf

legal representative(s) of

Board of Regents, The University of Texas System

an organization existing under the laws of

State of Texas, United States of America

and in present execution of its business activity, domiciled at

211 West 7th St., Austin, Texas 78701

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following: Regeneration of an Aqueous Solution From an Acid Gas Absorption Process by Multi-Stage Flashing and Stripping.

1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, extensions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.

2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.

3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or extensions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.

4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.

5) To register domain names before the competent entity.

6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.

7) To ratify or not the officious agency.

8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extra-judicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Austin, Texas USA

Granted and signed at

on this 9 day of November

of 2005 000182

Firma / signature

Signature

Barry D. Burgdorf

Vice Chancellor and General Counsel

CERTIFICADO NOTARIAL

(Cuando el solicitante es SOCIEDAD)

(Poderes otorgados en: El Salvador, Estados Unidos, México y Venezuela)

A los _____ días del mes de _____ de _____, el Notario que suscribe DA FE de que:

1. _____
(nombre de la persona que firma el poder)
mayor de edad y domiciliado _____
_____ firmó de su puño
y letra el documento que antecede.
2. Conoce al (a la) otorgante y que este (a) está legalmente capacitado para el otorgamiento.
3. El otorgante ha firmado el referido documento en su carácter de _____
de la persona jurídica _____
4. La citada persona jurídica con sede en _____
_____ está legalmente
constituida, que tiene actualmente
existencia legal y que el acto para el cual se ha otorgado este
poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.
5. El otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta, que
esta es legítima y que está facultado para otorgar este poder.
6. las anteriores certificaciones de los puntos 3, 4 y 5, me constan porque
he tenido a la vista los documentos auténticos.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe
autenticar la firma del Notario Público.

CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____ de _____, el Notario que suscribe DA FE de que:

1. _____
(nombre de la persona que firma el poder)
- mayor de edad y domiciliado en _____
_____ firmó en su presencia
el documento que antecede, conoce al otorgante y que este está
legalmente capacitado para el otorgamiento.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe
autenticar la firma del Notario Público.

Para todos los demás países el Señor Cónsul de Colombia o ante
quien se otorgue, debe expedir una certificación dejando constancia
1) de la existencia legal de la sociedad, 2) de que esta ejerce
actualmente su objeto social, y 3) de que la persona o personas que
otorgan el poder están facultadas para hacerlo, dejando
constancia así mismo de que tuvo a la vista las pruebas que acrediten
tales circunstancias.

LEGALIZACIÓN POR EL CONSUL DE COLOMBIA
O POR APOSTILLA

NOTARIAL CERTIFICATE

(When the applicant is a CORPORATION)

(Powers of attorney granted in: El Salvador, Mexico, U.S.A. and Venezuela)

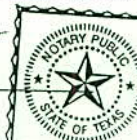
This 10th day of November, 2005
the undersigned Notary CERTIFIES that:
Barry D. Burgdorf

1. _____
(name of the person who signs the power of attorney)
of legal age and domiciled in Austin, Travis County, Texas
_____ set his hand on the
foregoing document.
2. The grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to
execute the document.
3. The grantor has executed the foregoing document in his capacity
of Vice Chancellor and General Counsel
of the juridical person Board of Regents, The University of
Texas System

4. The mentioned juridical person with place of business
in 211 West 7th St., Austin, Texas 78701
is duly organized, has actual legal existence and that the purposes for which
the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. The grantor has in fact the referred quality and that his/her
representation is legal and that he/she is empowered to grant this power
of attorney.
6. I have based the above certifications 3, 4 and 5, on the authentic documents
which for such purpose were exhibited to me.

Beverly Hurst
Notary Public



NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary
Public.

NOTARIAL CERTIFICATE (When the applicant is an INDIVIDUALS)

On this _____ day of _____
the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. _____
(name of the person who signs the Power of Attorney)

of legal age and domiciled at _____
_____ signed in his presence the foregoing
document, the grantor is to him personally known and that he/she has legal
capacity to execute the document.

Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary
Public.

For all other countries the Colombian Consul or before who it is granted
must issue a certification stating 1) the legal existence of the corporation,
2) that the corporate purposes are actually being accomplished, 3) that
the person or persons who grant this Power of Attorney are empowered to
do it. The Consul will certify also that the documents evidencing those
circumstances were exhibited to him.

LEGALIZATION BY THE COLOMBIAN CONSUL OR BY
APOSTILLE.

000183



The State of Texas

Secretary of State

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by BEVERLY HURST

3. acting in the capacity of Notary Public, State of Texas

4. and bears the seal/stamp of BEVERLY HURST, Notary Public, State of Texas, Commission Expires: 02-17-07

CERTIFIED

5. at Austin, Texas

6. on December 23, 2005

7. by the Secretary of State of Texas

8. Certificate No. N-505731

9. Seal

10. Signature:



Roger Williams

Roger Williams
Secretary of State
ST/lb

000184

TRADUCCION OFICIAL NO. 012/2006-.

APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

EL PRESENTE DOCUMENTO PUBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: BEVERLY HURST
3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: NOTARIO PUBLICO, ESTADO DE TEXAS.
4. LLEVA EL SELLO DE: BEVERLY HURST, NOTARIO PUBLICO, ESTADO DE TEXAS, CON COMISION QUE EXPIRA EL 17/02/07.

CERTIFICADO

5. EN: AUSTIN, TEXAS
6. EL: 23 DE DICIEMBRE, 2005
7. POR: EL SECRETARIO DE ESTADO DE TEXAS
8. BAJO EL NO.: N-505731
9. SELLO: GRAN SELLO DEL ESTADO DE TEXAS
10. FIRMA: ROGER WILLIAMS, SECRETARIO DE ESTADO

LA TRADUCTORA OFICIAL

Helena Uribe de Lemoine

HELENA URIBE DE LEMOINE



000185

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

402096
Helena Ube
CONTINUA POR EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 FEB 6 A 11:03

[Signature]
JEFE DE LEGACIONES
BOGOTA D.C.



TRADUCCION OFICIAL NO. 012/2006-.

EL TEXTO QUE SIGUE ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES, LLEVA SELLO Y FIRMA DE HELENA URIBE DE LEMOINE, TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL, SEGÚN RESOLUCION No. 3618 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA EL 6 DE SEPT. DE 1972

TRADUCCION DE LOS SELLOS QUE APARECEN EN EL PODER OTORGADO POR BARRY D. BURGDORF, REPRESENTANTE LEGAL DE LA JUNTA DIRECTIVA DEL SISTEMA DE LA UNIVERSIDAD DE TEXAS, UNA ORGANIZACIÓN QUE EXISTE BAJO LAS LEYES DEL ESTADO DE TEXAS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA, DOMICILIADA EN 211 WEST 7TH ST., AUSTIN, TEXAS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA, A LAS DOCTORAS DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN Y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ. OTORGADO Y FIRMADO EN AUSTIN, TEXAS, EL 9 DE NOVIEMBRE DE 2005.-

CERTIFICADO NOTARIAL

El 10 DE NOVIEMBRE DE 2005 el suscrito Notario CERTIFICA que:

1. El Señor Barry D. Burgdorf, de edad legal y domiciliado en Austin, Condado de Travis, Texas, firmó de su puño y letra el documento que antecede.
2. Conoce al Otorgante, quien está legalmente capacitado para el otorgamiento.
3. El otorgante ha firmado el referido documento en su carácter de Vice Canciller y Asesor General de la persona jurídica Junta de Regentes del Sistema de la Universidad de Texas,
4. La citada persona jurídica con domicilio comercial en 211 West 7th Street, Austin, Texas 78701, está legalmente constituida, tiene actualmente existencia legal y que el acto para el cual se ha otorgado este

Hele



000186

TRADUCCION OFICIAL NO. 012/2006-.

poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. El Otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta, que ésta es legítima y que está facultado para otorgar este poder.
6. Las anteriores certificaciones de los puntos 3, 4 y 5 me constan porque he tenido a la vista los documentos auténticos.

FIRMADO POR: BEVERLY HURST, NOTARIO PUBLICO, ESTADO DE TEXAS,
CON COMISION HASTA EL 7 DE FEBRERO, 2007.

HAY SELLO DEL NOTARIO.

Hele



000187

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0017708

Bogotá D.C., Febrero 21 de 2013 - 10:21:58

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	5297	18/01/2013		310.000.00
RECIBO DE CA	999999999	80765	06/08/2012		120.000.00
RECIBO DE CA	999999999	95634	17/09/2012		590.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
			\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-044004- -00000-0000

Fecha: 2013-03-05 15:09:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

000188

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 21 de 2013 - 10:21:58

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0021378
		Bogotá D.C., Marzo 04 de 2013 - 10:15:26

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	10073	01/02/2013		175.000.00
RECIBO DE CA	999999999	10134	01/02/2013		480.000.00
RECIBO DE CA	999999999	10182	01/02/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	10183	01/02/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	10184	01/02/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	10185	01/02/2013		530.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
9 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	270.000.00
			\$270.000.00

SON: **DOSCIENTOS SETENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-044004- -00000-0000
Fecha: 2013-03-05 15:09:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

000189



No. 13-044004- -00000-0000

Fecha: 2013-03-05 15:09:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO D

☐	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 INVENCION 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 ☐