



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE N°

07-32757

54. TÍTULO

"ANTICUERPOS ANTI-OX40L"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

C07K 16/46

71. SOLICITANTE

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

DOMICILIO

BASILEA, SUIZA

74. REPRESENTANTE LEGAL

ALICIA LLORED A RICAURTE

T.P.53.215

22. BOGOTÁ,D.C.

3^o MAR. 2007

FN 17-04-2007

Submision

(FORMA P 10)



PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-032757- -00000-0000
FIC: 2007-03-30 10:00:26 Usp. 2007-03-30 10:00:26
FIC: 11 PATENTE
E-371 FASE NACIONAL
AG 411 PRESENTACION FIC: 2007

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

① ☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

② SOLICITANTE (71)	Nombre: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG Dirección: Grenzacherstrasse 124 CH-4070 Basilea, Suiza Nacionalidad o Domicilio: Basilea, Suiza. Lugar de Constitución: Suiza. Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
③ REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>39.690.713</u> TP <u>53.215</u>
④ INVENTOR(ES) (72)	Nombre: ENDL, Josef; EUGUI, Elale; FUENTES, María Elena; GRAUS, Yvo; LABRIJN, Aran Frank; LANZENDOERFER, Martin; PARREN, Paul; REBERS, Frank; SCHUMACHER, Ralf; SEEGER, Stefan; VAN DE WINKEL, Jan y VAN VUGT, Martine. Dirección: Ulmenstrasse 12, 82362 Wehlheim; 2513 Hastings Dr., Belmont, CA 94002; 1490 Bittern Drive, Sunnyvale, Ca 94087; Werdorperwaard 3, NL-3984 PR Odijk; 2e Jan van der Heijdenstraat 66-3R, NL-1074 XW Amsterdam; Hofmeistrasse 25a, 82327 Tutzing; Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk; Adriaan Menninckwartier 34, NL-3554 ct Utrecht; Hochfeldstrasse 78, 82377 Penzberg; Braunerstrasse Weg 22, 82377 Penzberg; Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist; Fluweelmos 6, NL-3994 KR Houten. Nacionalidad o Domicilio: Alemania, Estados Unidos de América y Holanda.	

⑤ **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/EP2005/009968 Fecha: 16/09/05

Publicación Internacional No. WO 2006/029879 A3 Fecha: 23/03/06

⑥ **Título (54) "Anticuerpos Anti-OX40L"**

⑦ **Clasificación Internacional (51) C07K 16/46**

⑧ Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	EP EP	17-09-04 23-12-04	04022158.2 04030548.8

⑨ **Comprobante de Pago No. 07-14.345** Fecha: 19-02-07

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
RdC: 07-032757-00000-0000
FOLIO 207-03-30 105825 LRP. 2070 NUECHREALIONES
198.11 PATENTE
ENC 3/11 FASENACIONALII
ACT 411 PRESENTACION FOLIO 206

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 000176689-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 14,345
FECHA : FEBRERO 19 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	63769795	19/02/2007	5,260,000.

***** CONCEPTO *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
	TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS



RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

2

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES
LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o
GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o
ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS
RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la
sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados
para actuar individualmente, se esta presentando con esta solicitud.
En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno
de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente
expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en
cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No.

de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

Traducción de la apostilla en inglés que se encuentra a continuación de la legalización de las firmas de los señores Klausner y Strebel, representantes legales de F. Hoffmann-La Roche, que aparecen en un documento de Poder, escrito en español e inglés, conferido a ALICIA LLORED A y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, expedida en idioma inglés por el notario Peter Kuster, bajo el No. 2004/20, el 17-08-2004, en Basilea, Suiza.

AUTENTICACION OFICIAL

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suiza

Este documento público

2. Ha sido firmado por el Lic. iur. Peter Kuster

3. Actuando en calidad de notario público

4. Lleva el sello del mencionado notario

Certificado

5. en Basel (Basilea)

6. el 18 de agosto 2004

7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basel-Stadt

8. bajo el No 8835/13376

9. Sello

10. Firma

Cancillería de Estado

Fdo.: firma ilegible

de la ciudad de Basel (Basilea)

Ruedi Egge

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en estas oficinas para su confrontación.

Bogotá, 2 de septiembre 2004

SE CERTIFICA QUE EL ORIGINAL DEL DOCUMENTO QUE SE HA TRADUCIDO, HA SIDO VERIFICADO EN LAS OFICINAS DE LA CANCELERIA DE ESTADO DEL CANTON DE BASEL-STADT, Y SE HA CONSTATADO QUE LA TRADUCCION ES FIEL Y COMPLETA.

22 FEB 2007

PABLO BENDER BARAJAS
NOTARIO(E)

Udo Uricoechea
Maria Mercedes Uricoechea T.
Traductora Juramentada
Resolución 10607/81 Minjusticia

EN SE AUSENTE
RESPONSABLE DEL TEXTO

2004 SET -3 P 12:12

JCS
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

258651
Peng Uncochea
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPESA
LAS FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIO BENTO (B) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
22 FEB 2007
LO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

5

abajo firmados, F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Suiza.

con domicilio en 4070 Basilea, Suiza

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 8o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, ampliaciones, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; Instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo-respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, F.H. FFMANN-LA ROCHE AG, a corporation organized and existing under the laws of Switzerland.

domiciled at 4070 Basel, Switzerland

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and true that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit

PAULO MENDEZ SARAJAS
NOTARIO (E)

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 17th day of August 2008.
F. Hoffmann-La Roche AG

Fridolin Klausner
Holder of procuration

Denise Ströbel
Mandatory

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Sulza
Basilea

(ss)

El día 17 de Agosto de 2004, compareció Fridolin Klausner y Denise Strebel a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien deudamente juramentado declaró y dijo que él es titular del poder/mandatario de F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Sulza, domiciliada en la ciudad de Basilea, Sulza, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de Sulza; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la empresa Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este Instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de Incorporación firmados en Sulza, ciudad de Basilea, con fecha 19 JUNIO 1997, y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Switzerland
Basel

(ss)

On this 17th day of August 2004, personally, Fridolin Klausner and Denise Strebel came both Swiss citizens and Swiss residents, to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing Instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the Holder of Procuration/Mandatory of F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Switzerland, domiciled at the City of Basel, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of Switzerland; that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this Instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at Sulza, ciudad de Basilea, under date of 19th day of June 1997, and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

Basel, this 17-08-2004 (seventeenth day of two thousand and four)

D. P. Kuster
Notar

Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basel



Allg. Prot. - 4 - 20



OFFICIAL AUTHENTICATION
(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)

This official document

2. is signed by *P. Ruiz*

3. in his/her function as *Att. Not. C.*

4. and certified by the seal of the *Canton*

Certified **18. Aug. 2004**

5. in Basel (Bâle)

6. on

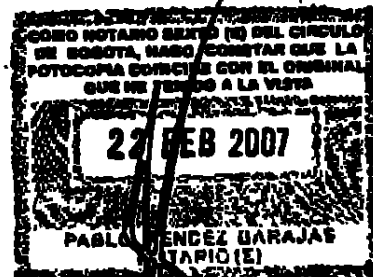
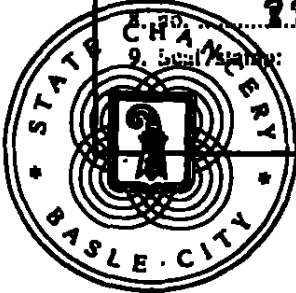
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

8. No. **2235 / 13 226**

9. Seal/Stamp:

10. Signature: *P.*

Ruiz Ruiz



Revisio folios 8, 9 y 10
Extracto y Torjetas

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2005/009968

A. CLASIFICACION DE MATERIA INV. C07K16/46 Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI		
B. CAMPOS BUSCADOS Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación) C07K C12N Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados) EPO-Interno, WPI Dato, PAJ, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Dato		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	NOHARA C ET AL: "Mejoramiento de la encefalomiелitis autoinmune experimental con el anticuerpo monoclonal ligando anti-OX40: un papel crítico para el ligando OX40 en la migración, pero no el desarrollo, de células T patogénicas" JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 DE FEBRERO DE 2001, vol. 166, no. 3, 1 de Febrero de 2001 (2001-02-01), páginas 2108-2115, XP002360582 ISSN: 0022-1767	1-8, 10-14, 16-21, 25-39, 43-46
X	resumen	15-18, 20-23, 32-39
☒ En el recuadro C se enumeran más documentos. ☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.		
* Categorías especiales de documentos citados: 'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular 'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional 'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica) 'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios 'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada 'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención 'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo 'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica '&' documento miembro de la misma familia de patentes		
Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional 8 de Mayo de 2006		Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional 21/06/2006
Nombre y dirección de correo de ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. No. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax No. (+31-70) 340-3016		Funcionario autorizado Celler, J

Forma PCT ISA 210 (segunda hoja) (Abril 2005)

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2005/009968

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
P, A	WANG Q ET AL: "Caracterización y estudio funcional de cinco nuevos anticuerpos monoclonales contra el OX40L humano resaltar la señalización inversa: Mejoramiento de la producción de IgG de células B y promoción de la maduración de DCs." TISSUE ANTIGENS. NOV 2004, vol. 64, no. 5, Noviembre de 2004 (2004-11), páginas 566-574, XP002360583 ISSN: 0001-2815 el documento completo	1-46
X	WO 95/05468 A (LYNXVALE LIMITED; CLARK, MICHAEL RONALD) 23 de Febrero de 1995 (1995-02-23)	1-8, 10-14, 16-21, 25-46
Y	resumen	15, 22-24
Y	página 25, línea 9 – línea 11	7, 8, 10-13, 19, 40-42
	página 25, línea 25 – página 26, línea 5 página 6, línea 3 – línea 6 página 7, línea 10 – línea 13 página 11, línea 19 – línea 25 página 12, línea 10 – línea 13 página 15, línea 20 – línea 23 página 18, línea 22 – línea 25 página 32 – página 33; reivindicaciones 1, 10, 11, 13	
X	WO 99/58572 A (CAMBRIDGE UNIVERSITY TECHNICAL SERVICES LIMITED; ARMOUR, KATHRYN, LESL) 18 de Noviembre 1999 (1999-11-18)	1-8, 10-14, 16-21, 25-39, 43-46
Y	resumen	7, 8, 10-13, 19, 40-42
	página 4, línea 1 – línea 6 página 5, línea 3 – línea 4 página 6, línea 14 – línea 18 página 7, línea 15 – línea 24 página 9, línea 10 – línea 13 página 10, línea 15 página 10, línea 29 – línea 31 página 24, línea 19 – línea 23 página 56; reivindicaciones 1, 10	

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2005/009968

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	HEZAREH M ET AL: "Actividades de función efectora de un panel de mutantes de un anticuerpo ampliamente neutralizante contra el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1." JOURNAL OF VIROLOGY. DEC 2001, vol. 75, no. 24, Diciembre de 2001 (2001-12), páginas 12161-12168, XP002339184 ISSN: 0022-538X resumen	1-8, 10-14, 16-21, 25-39, 43-46
Y	GRAM H ET AL: "Selección <i>In Vitro</i> y maduración de afinidad de anticuerpos a partir de una librería de inmunoglobulina combinatoria simple." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. 15 DE ABRIL DE 1992, vol. 89, no. 8, 15 de Abril de 1992 (1992-04-15), páginas 3576-3580, XP002379926 ISSN: 0027-8424 resumen	40
Y	SATAKE Y ET AL: "Caracterización del ligante OX40 de rata mediante un anticuerpo monoclonal" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. 21 DE ABRIL 2000, vol. 270, no. 3, 21 de Abril de 2000 (2000-04-21), páginas 1041-1048, XP002379927 ISSN: 0006-291X resumen	1-15, 22-46
X		15-18, 20-24
Y	TOTSUKA T ET AL: "Efecto terapéutico del MAbs anti-OX40 y anti-TNF-alfa en un modelo murino de colitis crónica" AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY. ABRIL 2003, vol. 284, no. 4, Abril de 2003 (2003-04), páginas G595-G603, XP002379928 ISSN: 0193-1857 resumen	1-15, 19, 22-46
X		1-15, 22-46
A	WO 01/94586 A (IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION) 13 de Diciembre de 2001 (2001-12-13) Discloses present SEQ ID NO: 52 el documento completo	1-46
A	WO 01/25492 A (BIOSITE DIAGNOSTICS INC; GENPHARM INTERNATIONAL A SUBSIDIARY OF MEDARE) 12 de Abril de 2001 (2001-04-12) Discloses present SEQ ID NO: 53 el documento completo	1-46

Forma PCT/ISA/210 (continuación de la hoja segunda) (Abril 2005)

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2005/009968

Cañilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del Item 2 de la primera hoja)

Este reporte de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.: -

porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber: Aunque las reivindicación 35 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/composición.

2. ☐ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:

3. ☐ Reivindicaciones No.:

porque son reivindicaciones dependientes y no están discipladas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Cañilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del Item 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:
ver hoja adicional

1. ☒ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.

2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.

3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:

4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta

- ☒ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.

- ☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

INFORMACION ADICIONAL CONTINUADA DE PCT/ISA/ 210

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró múltiples invenciones (grupos) en esta solicitud Internacional, como sigue:

1. Reivindicaciones: 1-14, 16-21 (parcialmente), 25-39 (parcialmente), 43-46

caracterizadas por la materia objeto común de las reivindicaciones 1, p.e., un anticuerpo caracterizado en que se enlaza a OX40L, contiene una parte de Fc derivada de origen humano y no se enlaza al factor de complemento C1q,

caracterizadas por la materia objeto común de la reivindicación 43, p.e., un anticuerpo que se enlaza a OX40L, es de clase IgG1 humano y contiene la mutación L234A/L235A y comprende como cadena pesada gama las SEC ID NOS: 59, 63 o 67,

caracterizadas por la materia objeto común de la reivindicación 45, p.e., un anticuerpo que se enlaza a OX40L, es de clase IgG4 humano y contiene la mutación S228P y comprende como cadena pesada gama las SEC ID NOS: 60, 64 o 68.

2. Reivindicaciones: 15, 16-21 (parcialmente), 25-39 (parcialmente)

Caracterizadas por la materia objeto común de la reivindicación 15, p.e., un anticuerpo caracterizado porque dicho anticuerpo se enlaza a OX40L, y comprende una combinación de región variable seleccionada independientemente de los grupos de secuencias de regiones variables proporcionadas en la lista bajo los puntos a-l, que relacionan las SEQ ID NOS: 1-12, 18-20

3. Reivindicaciones: 22, 23, 25-39 (parcialmente)

Caracterizadas por la materia objeto común de la reivindicación 22, p.e., un anticuerpo que se enlaza a OX40L, que comprende una cadena ligera variable y una cadena pesada variable, caracterizado porque la cadena pesada variable comprende CDR3 seleccionado de una lista de SEQ ID NOS: 33-38 y/o la cadena ligera variable comprende CDR3 seleccionado de SEQ ID NOS: 51-57.

4. Reivindicaciones: 24-35 (parcialmente), 39 (parcialmente)

Caracterizadas por la materia objeto común de la reivindicación 24, p.e., un anticuerpo que se produce mediante una línea celular seleccionada del grupo proporcionado en la reivindicación.

5. Reivindicación: 40

INFORMACION ADICIONAL CONTINUADA DE PCT/ISA/ 210

Dirigida a un método para modificar la secuencia de amino ácido inicial de una CDR de cadena pesada de anticuerpo base caracterizada por la SEQ ID NOS: 21-38 y/o una CDR de cadena ligera de anticuerpo base caracterizada por la SEQ ID NOS: 39-57, mediante la modificación de la secuencia de ácido nucleico codificadora con el fin de modificar 1 amino ácido en la CDR de cadena pesada, 1-2 amino ácidos en la CDR2 de cadena pesada, 1-2 amino ácidos en la CDR3 de cadena pesada, 1-3 amino ácidos en la CDR1 de cadena ligera, 1-3 amino ácidos en la CDR2 de cadena ligera, y/o 1-3 amino ácidos en la CDR3 de cadena ligera, expresando dichas secuencias modificadas en una estructura de anticuerpo, y midiendo el dicho anticuerpo se enlaza a OX40L con un valor dado de KD.

6. reivindicaciones: 41, 42

Caracterizada por la materia objeto común de la reivindicación 42, p.e., un anticuerpo que se enlaza a OX40L, es de clase IgG1 humano y comprende la cadena pesada gama de SEQ ID NOS: 58, 62 o 66.

14 **REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2005/009968

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda		Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9505468	A	23-02-1995	NONE	
WO 9958572	A	18-11-1999	AU 752185 B2	12-09-2002
			AU 3837399 A	29-11-1999
			BR 9910281 A	02-01-2001
			CA 2326801 A1	18-11-1999
			CN 1308637 A	15-08-2001
			EE 200000643 A	15-04-2002
			EP 1075496 A1	14-02-2001
			HU 0101915 A2	28-09-2001
			JP 2002514406 T	21-05-2002
			NO 20005612 A	29-12-2000
			NZ 507694 A	25-07-2003
			PL 343931 A1	10-09-2001
			RU 2226196 C2	27-03-2004
			TR 200003292 T2	21-03-2001
			ZA 200005870 A	25-10-2002
WO 0194586	A	13-12-2001	AU 7522401 A	17-12-2001
			CA 2410188 A1	13-12-2001
			EP 1299542 A2	09-04-2003
			JP 2003535592 T	02-12-2003
WO 0125492	A	12-04-2001	AU 783276 B2	06-10-2005
			AU 7849600 A	10-05-2001
			CA 2386709 A1	12-04-2001
			EP 1222314 A1	17-07-2002
			JP 2003527832 T	24-09-2003
			US 2003091995 A1	15-06-2003

72

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/009968

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/46

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NOHARA C ET AL: "Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis with anti-OX40 ligand monoclonal antibody: a critical role for OX40 ligand in migration, but not development, of pathogenic T cells." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 FEB 2001, vol. 166, no. 3, 1 February 2001 (2001-02-01), pages 2108-2115, XP002360582 ISSN: 0022-1767	1-8, 10-14, 16-21, 25-39, 43-46
X	abstract	15-18, 20-23, 32-39
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *B* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 May 2006

Date of mailing of the international search report

21/06/2006

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.O. Box 5010 Patentsstrasse 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-6540, Tx: 31 651 apo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Celler, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/009968

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	WANG Q ET AL: "Characterization and functional study of five novel monoclonal antibodies against human OX40L highlight reverse signalling: enhancement of IgG production of B cells and promotion of maturation of DCs." TISSUE ANTIGENS. NOV 2004, vol. 64, no. 5, November 2004 (2004-11), pages 566-574, XP002360583 ISSN: 0001-2815 the whole document	1-46
X	WO 95/05468 A (LYNXVALE LIMITED; CLARK, MICHAEL, RONALD) 23 February 1995 (1995-02-23)	1-8, 10-14, 16-21, 25-46
Y	abstract	15, 22-24
Y	page 25, line 9 - line 11 page 25, line 25 - page 26, line 5 page 6, line 3 - line 6 page 7, line 10 - line 13 page 11, line 19 - line 25 page 12, line 10 - line 13 page 15, line 20 - line 23 page 18, line 22 - line 25 page 32 - page 33; claims 1,10,11,13	7,8, 10-13, 19,40-42
X	WO 99/58572 A (CAMBRIDGE UNIVERSITY TECHNICAL SERVICES LIMITED; ARMOUR, KATHRYN, LESL) 18 November 1999 (1999-11-18)	1-8, 10-14, 16-21, 25-39, 43-46
Y	abstract page 4, line 1 - line 6 page 5, line 3 - line 4 page 6, line 14 - line 18 page 7, line 15 - line 24 page 9, line 10 - line 13 page 10, line 15 page 10, line 29 - line 31 page 24, line 19 - line 23 page 56; claims 1,10	7,8, 10-13, 19,40-42
	— —/—	

INTERNATI NAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/EP2005/009968

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HEZAREH M ET AL: "Effector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1." JOURNAL OF VIROLOGY. DEC 2001, vol. 75, no. 24, December 2001 (2001-12), pages 12161-12168, XP002339184 ISSN: 0022-538X abstract	1-8, 10-14, 16-21, 25-39, 43-46
Y	GRAM H ET AL: "In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. 15 APR 1992, vol. 89, no. 8, 15 April 1992 (1992-04-15), pages 3576-3580, XP002379926 ISSN: 0027-8424 abstract	40
Y	SATAKE Y ET AL: "Characterization of rat OX40 ligand by monoclonal antibody." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. 21 APR 2000, vol. 270, no. 3, 21 April 2000 (2000-04-21), pages 1041-1048, XP002379927 ISSN: 0006-291X abstract	1-15, 22-46
X		15-18, 20-24
Y	TOTSUKA T ET AL: "Therapeutic effect of anti-OX40L and anti-TNF-alpha MAb in a murine model of chronic colitis." AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY. APR 2003, vol. 284, no. 4, April 2003 (2003-04), pages G595-G603, XP002379928 ISSN: 0193-1857 abstract	1-15,19, 22-46
X		1-15, 22-46
A	WO 01/94586 A (IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION) 13 December 2001 (2001-12-13) Discloses present SEQ ID NO:52 the whole document	1-46
A	WO 01/25492 A (BIOSITE DIAGNOSTICS INC; GENPHARM INTERNATIONAL A SUBSIDIARY OF MEDARE) 12 April 2001 (2001-04-12) Discloses present SEQ ID NO: 53 the whole document	1-46

5

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2003)

page 3 of 3

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/009968

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 35 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-14,16-21(partly), 25-39(partly),43-46

characterised by the common subject matter of claims 1, i.e. an antibody characterised in that it binds OX40L, contains a Fc part derived from human origin and does not bind complement factor C1q,
characterised by the common subject matter of claim 43, i.e. an antibody that binds OX40L, is of human IgG1 class and contains mutation L234A/L235A and comprises as gamma heavy chain SEQ ID NOS: 59,63 or 67,
characterised by the common subject matter of claim 45, i.e. an antibody that binds OX40L, is of human IgG4 class and contains mutation S228P and comprises as gamma heavy chain SEQ ID NOS: 60,64 or 68,

2. claims: 15,16-21(partly),25-39(partly)

characterised by the common subject matter of claims 15, i.e. an antibody characterised in that said antibody binds OX40L and comprises a variable region combination independently selected from the groups of sequences of variable regions provided in the list under points a-i. which relate to SEQ ID NOS: 1-12,16-20

3. claims: 22,23,25-39(partly)

characterised by the common subject matter of claims 22, i.e. an antibody binding OX40L comprising a variable light chain and variable heavy chain, characterised in that the variable heavy chain comprises CDR3 selected from a list of SEQ ID NOS: 33-38 and/or the variable light chain comprises CDR3 selected from SEQ ID NOS: 51-57

4. claims: 24-35(partly),39(partly)

characterised by the common subject matter of claim 24, i.e. an antibody that is produced by a cell line selected from the group provided in the claim.

5. claim: 40

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

directed to a method of modifying the initial amino acid sequence of an parent antibody heavy chain CDR characterised by SEQ ID NOS: 21-38 and/or an parent antibody light chain CDR characterised by SEQ ID NOS: 39-57, by modifying encoding nucleic acid sequence so as to modify 1 amino acid in heavy chain CDR, 1-2 amino acids in heavy chain CDR2, 1-2 amino acids in heavy chain CDR3, 1-3 amino acids in light chain CDR1, 1-3 amino acids in light chain CDR2 and/or 1-3 amino acids in light chain CDR3, expressing said modified sequences in an antibody structure and measuring whether said antibody binds to OX40L with a given value of KD.

6. claims: 41,42

characterised by the common subject matter of claim 42, i.e. an antibody that binds OX40L, is of human IgG1 class and comprises gamma heavy chain SEQ ID NOS: 58,62 or 66.

28

INTERNATIONAL SEARCH REP RT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2005/009968

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9505468	A	23-02-1995	NONE	
WO 9958572	A	18-11-1999	AU 752185 B2	12-09-2002
			AU 3837399 A	29-11-1999
			BR 9910281 A	02-01-2001
			CA 2326501 A1	18-11-1999
			CN 1308637 A	15-08-2001
			EE 200000643 A	15-04-2002
			EP 1075496 A1	14-02-2001
			HU 0101915 A2	28-09-2001
			JP 2002514406 T	21-05-2002
			NO 20005612 A	29-12-2000
			NZ 507694 A	25-07-2003
			PL 343931 A1	10-09-2001
			RU 2226196 C2	27-03-2004
			TR 200003292 T2	21-03-2001
			ZA 200005870 A	25-10-2002
WO 0194586	A	13-12-2001	AU 7522401 A	17-12-2001
			CA 2410188 A1	13-12-2001
			EP 1299542 A2	09-04-2003
			JP 2003535592 T	02-12-2003
WO 0125492	A	12-04-2001	AU 783276 B2	06-10-2005
			AU 7849600 A	10-05-2001
			CA 2385709 A1	12-04-2001
			EP 1222314 A1	17-07-2002
			JP 2003527832 T	24-09-2003
			US 2003091995 A1	15-05-2003

22

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación

23 de Marzo de 2006 (23.03.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 2006/029879 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes¹: C07K 16/46

(74) Agente: SCHREINER Siegfried; Roche Diagnostics GmbH, Patent Department (TR-E), Postfach 11 52, 82372 Penzberg (CH).

(21) Número de Solicitud Internacional:

PCT/EP2005/009968

(81) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario para cada tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Fecha de Registro Internacional: 16 de Septiembre de 2005 (16.09.2005)

(25) Idioma de registro:

Inglés

(26) Idioma de Publicación:

Inglés

(30) Información de Prioridad:

04022158.2
04030546.8

17 de Septiembre de 2004 (17.09.2004)
23 de Diciembre de 2004 (23.12.2004)

EP
EP

(84) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario para cada tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasia (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitante: (para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

Declaración bajo la Regla 4.17:
- de la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América solamente) ENDL, Josef [DE/DE]; Ulmenstrasse 12, 82362 Weilheim (DE). EUGUL, Elise [US/US]; 2513 Hastings Dr., Belmont, CA 94002 (US). FUENTES, Maria [US/US]; 1413 South Mary Ave., Sunnyvale, Ca 94087 (US). GRAUS, Yvo [NL/NL]; Werdorperwaard 3, NL-3984 PR Odijk (NL). LABRIJN, Aran [NL/NL]; 2e Jan van der Heijdenstraat 66-3R, NL-1074 XW Amsterdam (NL). LANZENDOERFER, Martin [DE/DE]; Hofmeisterstrasse 25, 82327 Tutzing (DE). PARREN, Paul [NL/NL]; Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk (NL). REBERS, Frank [NL/NL]; Adriaan Menninckwartier 34, NL-3554 ct Utrecht (NL). SCHUMACHER, Ralf [DE/DE]; Hochfeldstrasse 78, 82377 Penzberg (DE). SEEGER, Stefan [DE/DE]; Saalanger 34, 82377 Penzberg (DE). VAN DE WINKEL, Jan [NL/NL]; Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist (NL). VAN VUGT, Martin [NL/NL]; Fluweelmos 6, NL-3994 KR Houten (NL).

Publicado:
- con reporte de búsqueda internacional
- con (una) indicación(s) en relación al material biológico depositado proporcionado bajo la Regla 13bis deparadamente de la descripción

(86) Fecha de publicación del reporte de búsqueda internacional:
8 de Septiembre de 2006

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Gulas sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: "ANTICUERPOS ANTI-OX40L"

(57) Resumen: Este invención se relaciona con anticuerpos anti-OX40L y, en particular, con anticuerpos anti-OX40L y variantes de los mismos que contienen una parte Fc derivada de origen humano y no se unen al factor C1q del complemento. Estos anticuerpos tienen nuevas e inventivas propiedades que causan un beneficio para un paciente que sufre de enfermedades inflamatorias.

22

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
23 March 2006 (23.03.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/029879 A3

(51) International Patent Classification: C07K 16/46

(74) Agent: SCHREINER, Siegfried; Roche Diagnostics GmbH, Patent Department (TR-B), Postfach 11 52, 82372 Penzberg (CH).

(21) International Application Number:
PCT/EP2005/009968

(22) International Filing Date
16 September 2005 (16.09.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
04022158.2 17 September 2004 (17.09.2004) EP
04030546.8 23 December 2004 (23.12.2004) EP

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): F.HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): .ENDL, Josef [DE/DE]; Ulmenstrasse 12, 82362 Weilheim (DE). EUGUI, Koko [US/US]; 2513 Hastings Dr., Belmont, CA 94002 (US). FUENTES, Maria [US/US]; 1413 South Mary Ave., Sunnyvale, Ca 94087 (US). GRAUS, Yvo [NL/NL]; Werdorperwaard 3, NL-3984 PR Odijk (NL). LABRUIJ, Arian [NL/NL]; 2e Jan van der Heijdenstraat 66-3R, NL-1074 XW Amsterdam (NL). LANZENDORFER, Martijn [DE/DE]; Hofmahrstrasse 25a, 82327 Tutzing (DE). PARRIN, Paul [NL/NL]; Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk (NL). REBERS, Frank [NL/NL]; Adriaan Manninckwartier 34, NL-3554 CT Utrecht (NL). SCHUMACHER, Ralf [DE/DE]; Hochfeldstrasse 78, 82377 Penzberg (DE). SEIBER, Stefan [DE/DE]; Seelanger 34, 82377 Penzberg (DE). VAN DE WINKEL, Jan [NL/NL]; Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist (NL). VAN VUGT, Marlies [NL/NL]; Fluweelmos 6, NL-3994 KR Houten (NL).

Declaration under Rule 4.17:
— of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:
— with international search report
— with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description

(88) Date of publication of the international search report:
8 September 2006

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ANTI-OX40L ANTIBODIES

(57) Abstract: This invention relates to anti-OX40L antibodies and, in particular, to anti-OX40L antibodies and variants thereof that contain a Fc part derived from human origin and do not bind complement factor C1q. These antibodies have new and inventive properties causing a benefit for a patient suffering from inflammatory diseases.

WO 2006/029879 A3

24

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

NOTIFICACION DEL REGISTRO
DE UN CAMBIO(Regla 92 bis. 1 del PCT e
Instrucciones Administrativas, Sección 422)

Para:

SCHREINER, Siegfried
Roche Diagnostics GmbH
Patent Department (TR-E)
Postfach 11 52
82372 Penzberg
SulzaFecha de envío por correo (día/mes/año)
12 de Diciembre de 2006 (12.12.2006)Archivo de referencia del solicitante o agente
22672 WO-SR

NOTIFICACION IMPORTANTE

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2005/009968Fecha de registro internacional (día/mes/año)
16 de Septiembre de 2005 (16.09.2005)

1. Las siguientes indicaciones aparecieron en el registro en relación con:

☒ el solicitante☒ el inventor☐ el agente☐ el representante comúnNombre y Dirección
SEEBER, Stefan
Saalanger 34
82377 Penzberg
AlemaniaPaís de Nacionalidad
DEPaís de Residencia
DE

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

2. La Oficina Internacional por el presente notifica al solicitante que el siguiente cambio se ha registrado en relación con:

☐ la persona☐ el nombre☒ la dirección☐ la nacionalidad☐ la residenciaNombre y Dirección
SEEBER, Stefan
Breunetsrieder Weg 22
82377 Penzberg
AlemaniaPaís de Nacionalidad
DEPaís de Residencia
DE

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

3. Otras observaciones, si fuese necesario:

4. Se ha enviado una copia de esta notificación a:

☒ la Oficina que recibe☐ las Oficinas designadas relacionadas☐ la Autoridad de Búsqueda Internacional☒ las Oficinas seleccionadas relacionadas☐ la Autoridad de Examen Preliminar Internacional☐ otros:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsímile No.: (41-22) 338.82.70

Funcionario autorizado
Aumaitre Chantal

Facsímile No. +41 22 338 70 80

Teléfono No. +41 22 338 86 69

27

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SCHREINER, Siegfried
Roche Diagnostics GmbH
Patent Department (TR-B)
Postfach 11 52
82372 Penzberg
SUISSE

Roche Diagnostics GmbH Patent Department Penzberg			
ACK	20. Dez. 2006		WN
BK			WJ
BUR	HH	HIL	MI
			SR

IMPORTANT NOTIFICATION

Date of mailing (day/month/year)
12 December 2006 (12.12.2006)Applicant's or agent's file reference
22672 WO SRInternational application No.
PCT/EP2005/009968International filing date (day/month/year)
16 September 2005 (16.09.2005)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

SEEBER, Stefan
Saalanger 34
82377 Penzberg
Germany.

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

SEEBER, Stefan
Breunetsrieder Weg 22
82377 Penzberg
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Aumaitre Chantal

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Facsimile No. +41 22 338 70 80

Telephone No. +41 22 338 86 69

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

NOTIFICACION DEL REGISTRO
DE UN CAMBIO

(Regla 92 bis. 1 del PCT e
Instrucciones Administrativas, Sección 422)

Para:

SCHREINER, Siegfried
Roche Diagnostics GmbH
Patent Department (TR-E)
Postfach 11 52
82372 Penzberg
Suiza

Fecha de envío por correo (día/mes/año)
12 de Diciembre de 2006 (12.12.2006)

Archivo de referencia del solicitante o agente
22672 WO-SR

NOTIFICACION IMPORTANTE

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2005/009968

Fecha de registro internacional (día/mes/año)
16 de Septiembre de 2005 (16.09.2005)

2. Las siguientes indicaciones aparecieron en el registro en relación con:

☒ el solicitante ☒ el inventor ☐ el agente ☐ el representante común

Nombre y Dirección
FUENTES, María
1413 South Mary Ave.
Sunnyvale, Ca 94087
Estados Unidos de América

País de Nacionalidad
US

País de Residencia
US

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

2. La Oficina Internacional por el presente notifica al solicitante que el siguiente cambio se ha registrado en relación con:

☐ la persona ☐ el nombre ☒ la dirección ☐ la nacionalidad ☐ la residencia

Nombre y Dirección
FUENTES, María
1490 Bittern Drive
Sunnyvale, Ca 94087
Estados Unidos de América

País de Nacionalidad
US

País de Residencia
US

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

3. Otras observaciones, si fuese necesario:

4. Se ha enviado una copia de esta notificación a:

☒ la Oficina que recibe ☐ las Oficinas designadas relacionadas
☐ la Autoridad de Búsqueda Internacional ☒ las Oficinas seleccionadas relacionadas
☐ la Autoridad de Examen Preliminar Internacional ☐ otros:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsímile No.: (41-22) 338.82.70

Funcionario autorizado
Aumaitre Chantal

Facsímile No. +41 22 338 70 80
Teléfono No. +41 22 338 86 69

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year) 12 December 2006 (12.12.2006)	To: SCHREINER, Siegfried Roche Diagnostics GmbH Patent Department (TR-5) Postfach 11 52 82372 Penzberg SUISSE															
Applicant's or agent's file reference 22672 WG-SR	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="5" style="text-align: center;">Roche Diagnostics GmbH Patent Department Penzberg</td> </tr> <tr> <td style="width: 15%; text-align: center;">ASK</td> <td style="width: 15%; text-align: center;">WN</td> <td style="width: 15%; text-align: center;">20. Dez. 2006</td> <td style="width: 15%; text-align: center;">WN</td> <td style="width: 15%; text-align: center;">WN</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BUR</td> <td style="text-align: center;">HH</td> <td style="text-align: center;">HIL</td> <td style="text-align: center;">MI</td> <td style="text-align: center;">SH</td> </tr> </table>	Roche Diagnostics GmbH Patent Department Penzberg					ASK	WN	20. Dez. 2006	WN	WN	BUR	HH	HIL	MI	SH
Roche Diagnostics GmbH Patent Department Penzberg																
ASK	WN	20. Dez. 2006	WN	WN												
BUR	HH	HIL	MI	SH												
International application No. PCT/EP2005/009968	International filing date (day/month/year) 18 September 2005 (18.09.2005)															

IMPORTANT NOTIFICATION

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
 ☒ the inventor
 ☐ the agent
 ☐ the common representative

Name and Address FUENTES, Maria 1413 South Mary Ave. Sunnyvale, Ca 94087 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
Telephone No. 		
Facsimile No. 		
Teleprinter No. 		

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person
 ☐ the name
 ☒ the address
 ☐ the nationality
 ☐ the residence

Name and Address FUENTES, Maria .490 Bittern Drive Sunnyvale, Ca 94087 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
Telephone No. 		
Facsimile No. 		
Teleprinter No. 		

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
 ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority
 ☒ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority
 ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70	Authorized officer Aumaitre Chantal Facsimile No. +41 22 338 70 80 Telephone No. +41 22 338 86 69
---	---

**INDICACIONES RELACIONADAS CON MICROORGANISMOS U OTRO
MATERIAL BIOLÓGICO DEPOSITADO**

(Regla PCT 13bis)

A. Las indicaciones hechas a continuación relacionadas con microorganismos u otro material biológico depositado referido en la descripción en la página 24, línea 9 – 20	
B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO Depósitos adicionales se identifican en una hoja adicional <u> </u>	
Nombre de la Institución depositaria Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH (DSMZ)	
Dirección de la Institución depositaria (incluyendo código postal y país) Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig Alemania	
Fecha del depósito 27.07.2004* / 02.09.2004 **	Número de Acceso DSM ACC2872*,
C. INDICACIONES ADICIONALES (dejar en blanco si no aplica) Esta información continúa en una hoja adicional <u>X</u>	
Indicaciones relacionadas con la Solución Experta con respecto al material biológico depositado DSM ACC 2872*, DSM ACC2885**, DSM ACC2886**, DSM ACC2888** y DSM ACC2889**	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS CUALES SE HACEN LAS INDICACIONES (Si las indicaciones no son para todos los estados designados)	
CA (Canadá), EP (Patente Europea), SG (Singapur)	
E. SUMINISTRO SEPARADO DE INDICACIONES (dejar en blanco si no aplica)	
Las indicaciones enumeradas a continuación serán presentadas al Buró Internacional después (especificar la naturaleza general de las indicaciones, p.e., "Número de Acceso de Depósito")	

Para uso de la Oficina receptora solamente
<u> </u> Esta hoja fue recibida con la solicitud internacional
Funcionario autorizado

Para uso del buró Internacional solamente
<u>X</u> esta hoja fue recibida por el Buró Internacional el: 16 de Diciembre de 2005 (16.12.2005)
Funcionario autorizado (firma ilegible) Wagner, Nathalie

C. INDICACIONES ADICIONALES (hoja adicional)

Solicitantes : F. Hoffmann – La Roche AG., et al.
Expediente de referencia de :
los solicitantes: 22672 WO-SR
Solicitud Internacional No. : PCT/EP2005/009968

**Indicaciones relacionadas con la "Solución del Experto" con respecto al
Material Biológico Depositado Referido en la Descripción**

Las indicaciones relacionadas con el material biológico están todas contenidas en la descripción. No se requiere que las siguientes indicaciones adicionales sean parte de la descripción y deben ser tratadas como "indicaciones separadas". Se relacionan solamente con la "Solución del Experto".

Las indicaciones adicionales hechas a continuación para el material biológico depositado referidas como:

hu Mab<hOX40L>LC.001	DSM ACC2672
hu Mab<hOX40L>LC.005	DSM ACC2685
hu Mab<hOX40L>LC.010	DSM ACC2686
hu Mab<hOX40L>LC.019	DSM ACC2688
hu Mab<hOX40L>LC.033	DSM ACC2689

en la descripción de la página 24.

Las indicaciones adicionales son:

Para la designación de CA (Canadá).

Con respecto a la designación de Canadá, las muestras del material biológico depositado estarán disponibles hasta el otorgamiento de la patente Canadiense, o hasta la fecha en la cual la patente es rechazada, o es abandonada o no sometida a más restablecimiento, o es retirada, como se contempla en las Reglas 107 y 108 de la Regla de Patentes bajo el Acto de Patentes Canadiense, solamente por la emisión de una muestra a un experto independiente nombrado por el Comisionado (Regla 104(4)).

Para la designación de EP (Patente Europea):

Con respecto a la designación de la EPO, las muestras del material biológico depositado estarán disponibles hasta la publicación de la mención de otorgamiento de la patente Europea, o hasta 20 años a partir de la fecha de presentación si la solicitud es rechazada o retirada o se considera que fue retirada, como se contempla en la Regla 28(3) de las Regulaciones de Implementación bajo la EPC, solamente por la emisión de una muestra a un experto nombrado por un solicitante (Regla 28(4) EPC).

Para la designación de SG (Singapur)

Los solicitantes de la presente dan aviso de nuestra intención que las muestras del cultivo identificado anteriormente están disponibles solamente para los expertos de acuerdo con el párrafo 3 del Anexo Cuarto de las Reglas de Patentes 1995.

Form PCT/RO/134 (July 1998; reprint January 2004)

C. ADDITIONAL INDICATIONS (additional sheet)

Applicants : F. Hoffmann-La Roche AG, et al.
Applicants file reference : 22672 WO-SR
International application No. : PCT/EP2005/009968

**Indications Relating to the Expert Solution in Respect of Deposited Biological Material
Referred to in the Description**

The indications relating to deposited biological material are all contained in the description. The following additional indications are not required to be part of the description and should be treated as "separate indications." They relate only to the expert solution.

The additional indications made below relate to the deposited biological material referred to as:

hu Mab<hOX40L>LC.001	DSM ACC2672
hu Mab<hOX40L>LC.005	DSM ACC2685
hu Mab<hOX40L>LC.010	DSM ACC2686
hu Mab<hOX40L>LC.019	DSM ACC2688
hu Mab<hOX40L>LC.033	DSM ACC2689

in the description on page 24.

The additional indications are:

For CA (Canada) designation:

In respect of the designation of Canada, samples of the deposited biological material will be made available until the grant of the Canadian patent, or until the date on which the application is refused, or is abandoned and no longer subject to reinstatement, or is withdrawn, as provided in Rules 107 and 108 of the Patent Rules under the Canadian Patent Act, only by the issue of a sample to an independent expert nominated by the Commissioner (Rule 104(4))

For EP (European Patent) designation:

In respect of the designation of the EPO, samples of the deposited biological material will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent, or until 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, as provided in Rule 28(3) of the Implementing Regulations under the EPC, only by the issue of a sample to an expert nominated by requester (Rule 28(4) EPC).

For SG (Singapore) designation:

Applicants hereby give notice of our intention that samples of the above-identified culture shall be available only to experts in accordance with paragraph 3 of the Fourth Schedule to the Patents Rules 1995.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS CON PROPOSITOS DE
PROCEDIMIENTO DE PATENTE

FORMULARIO INTERNACIONAL

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim
F. Hoffman – La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffman – La Roche Inc,
340 Kingsland Street
Nutley, NJ 07110-1199, USA

RECIBO EN EL CASO DE UN
DEPOSITO ORIGINAL, emitido
conforme a la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA
INTERNACIONAL, identificada al
final de esta página

1. IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
Referencia de Identificación dada por el DEPOSITANTE: hu-Mab<hOx40L>LC.001	Número de Acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: DSM ACC2872
II. DESCRIPCION CIENTIFICA Y/O DESIGNACION TAXONOMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo I, anterior estaba acompañado por: () una descripción científica () una designación taxonómica propuesta (marque con una X si es aplicable)	
III. RECIBO Y ACEPTACION	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I, anterior, que fue recibido por esta el 2004-07-27 (fecha del depósito original) ¹ .	
IV. RECIBO Y SOLICITUD DE CONVERSION	
El microorganismo identificado bajo I anterior fue recibido por esta Autoridad Depositaria Internacional el (Fecha de depósito original) y una solicitud de convertir el depósito original a un depósito bajo el Tratado de Budapest fue recibida por esta el (Fecha de solicitud de conversión)	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Dirección: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizados(s): (firma ilegible) Fecha: 2004-08-11

¹ Cuando aplica la regla 6.4(d), tal fecha es la fecha en la cual el estado de la autoridad depositaria internacional fue adquirido.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS CON PROPOSITOS DE
PROCEDIMIENTO DE PATENTE

FORMULARIO INTERNACIONAL

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim
F. Hoffman – La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffman – La Roche Inc,
340 Kingsland Street
Nutley, NJ 07110-1199, USA

DECLARACION DE VIABILIDAD
emitida conforme a la Regla 10.2
por la AUTORIDAD DEPOSITARIA
INTERNACIONAL, identificada al
final de esta página

I. DEPOSITANTE		II. IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
Nombre: Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim Dirección: F. Hoffman – La Roche AG 124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel Hoffman – La Roche Inc. 340 Kingsland Street Nutley, NJ 07110-1199, USA		Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: DSM ACC2672 Fecha del depósito o la transferencia ¹ : 2004-07-27	
II. DECLARACIÓN DE VIABILIDAD			
La viabilidad del microorganismo identificado bajo II anterior fue probada el 2004-07-27 ² . (X) ³ viable () ³ no viable más			
IV. CONDICIONES BAJO LAS CUALES SE REALIZO LA PRUEBA DE VIABILIDAD ⁴			
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL			
Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Dirección: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizados(s): (firma ilegible) Fecha: 2004-08-11	

¹ Indicar la fecha del depósito original, o cuando se ha hecho una nuevo depósito o transferencia, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).
² En los casos referidos en la Regla 10.2(a) (ii) y (iii), referirse a la prueba de viabilidad más reciente.
³ Marque con una equis la casilla aplicable
⁴ Llene si la información ha sido requerida y si los resultados de la prueba fueron negativos

34

CASO 22672 CO

+ Hoffmann La Roche AG

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

35
DSMZ

Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH

INTERNATIONAL FORM

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street
Nutley, NJ 07110-1199, USA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: hu-Mab<hOx40L>LC.001	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2672
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2004-07-27 (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 2004-08-11

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

DSMZ³⁶
Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH

INTERNATIONAL FORM

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street
Nutley, NJ 07110-1199, USA

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM			
Name: Roche Diagnostics GmbH Address: Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim F. Hoffmann-La Roche AG 124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel Hoffmann-La Roche Inc. 340 Kingsland Street Nutley, NJ 07110-1199, USA		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2672 Date of the deposit or the transfer¹: 2004-07-27			
III. VIABILITY STATEMENT					
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2004-07-27 ² . On that date, the said microorganism was ☒ ³ viable ☐ ³ no longer viable					
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴					
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY					
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Marchfelder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 2004-08-11			

- ¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

37

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS CON PROPOSITOS DE
PROCEDIMIENTO DE PATENTE

FORMULARIO INTERNACIONAL

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim
F. Hoffman – La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffman – La Roche Inc,
340 Kingsland Street
Nutley, NJ 07110-1199, USA

RECIBO EN EL CASO DE UN
DEPOSITO ORIGINAL, emitido
conforme a la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA
INTERNACIONAL, identificada al
final de esta página

1. IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
Referencia de Identificación dada por el DEPOSITANTE: hu-Mab<hOx40L>LC.005	Número de Acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: DSM ACC2885
II. DESCRIPCION CIENTIFICA Y/O DESIGNACION TAXONOMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo I, anterior estaba acompañado por: () una descripción científica () una designación taxonómica propuesta (marque con una X si es aplicable)	
III. RECIBO Y ACEPTACION	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I, anterior, que fue recibido por esta el 2004-09-02 (fecha del depósito original) ¹ .	
IV. RECIBO Y SOLICITUD DE CONVERSION	
El microorganismo identificado bajo I anterior fue recibido por esta Autoridad Depositaria Internacional el (Fecha de depósito original) y una solicitud de convertir el depósito original a un depósito bajo el Tratado de Budapest fue recibida por esta el (Fecha de solicitud de conversión)	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Dirección: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizados(s): (firma ilegible) Fecha: 2004-10-05

¹ Cuando aplica la regla 6.4(d), tal fecha es la fecha en la cual el estado de la autoridad depositaria internacional fue adquirido.

47 40

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS CON PROPOSITOS DE
PROCEDIMIENTO DE PATENTE**

FORMULARIO INTERNACIONAL

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim
F. Hoffman – La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffman – La Roche Inc,
340 Kingsland Street
Nutley, NJ 07110-1199, USA

DECLARACION DE VIABILIDAD
emitida conforme a la Regla 10.2
por la AUTORIDAD DEPOSITARIA
INTERNACIONAL, identificada al
final de esta página

I. DEPOSITANTE		II. IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
Nombre: Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Str. 166, D-68305 Mannheim Dirección: F. Hoffman – La Roche AG 124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel Hoffman – La Roche Inc. 340 Kingsland Street Nutley, NJ 07110-1199, USA		Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: DSM ACC2685 Fecha del depósito o la transferencia ¹ : 2004-09-02	
III. DECLARACION DE VIABILIDAD			
La viabilidad del microorganismo identificado bajo II anterior fue probada el 2004-09-06 ² (X) ³ viable () ³ no viable más			
IV. CONDICIONES BAJO LAS CUALES SE REALIZO LA PRUEBA DE VIABILIDAD⁴			
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL			
Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Dirección: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizados(s): (firma ilegible) Fecha: 2004-10-05	

Indicar la fecha del depósito original, o cuando se ha hecho una nuevo depósito o transferencia,
la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

² En los casos referidos en la Regla 10.2(a) (ii) y (iii), referirse a la prueba de viabilidad más reciente.

³ Marque con una equis la casilla aplicable

⁴ Llène si la información ha sido requerida y si los resultados de la prueba fueron negativos

INTERNATIONAL FORM

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340, Kingsland Street
Nutley, NJ 07110-1199, USA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: hu-Mab<hOx40L>LC.005	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2685
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2004-09-02 (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): V. Wechs Date: 2004-10-05

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

40
DSMZ
Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH

INTERNATIONAL FORM

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340, Kingaland Street
Nutley, NJ 07110-1199, USA

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM			
Name: Roche Diagnostics GmbH Address: Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim F. Hoffmann-La Roche AG 124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel Hoffmann-La Roche Inc. 340, Kingaland Street Nutley, NJ 07110-1199, USA		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2685 Date of the deposit or the transfer¹: 2004-09-02			
III. VIABILITY STATEMENT					
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2004-09-06 ¹ . On that date, the said microorganism was ☒ ¹ viable ☐ ² no longer viable					
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴					
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY					
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 2004-10-05			

- ¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Form DSMZ-BP/9 (sole page) 12/2001

43

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS CON PROPOSITOS DE
PROCEDIMIENTO DE PATENTE

FORMULARIO INTERNACIONAL

Roche Diagnostics GmbH

Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim

F. Hoffman – La Roche AG

124 Grenzachstr., CH-4070 Basel

Hoffman – La Roche Inc,

340 Kingsland Street

Nutley, NJ 07110-1199, USA

RECIBO EN EL CASO DE UN
DEPOSITO ORIGINAL, emitido
conforme a la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA
INTERNACIONAL, identificada al
final de esta página

1. IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
Referencia de Identificación dada por el DEPOSITANTE: hu-Mab<hOx40L>LC.010	Número de Acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: DSM ACC2886
II. DESCRIPCION CIENTIFICA Y/O DESIGNACION TAXONOMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo I, anterior estaba acompañado por: () una descripción científica () una designación taxonómica propuesta (marque con una X si es aplicable)	
III. RECIBO Y ACEPTACION	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I, anterior, que fue recibido por esta el 2004-09-02 (fecha del depósito original) ¹ .	
IV. RECIBO Y SOLICITUD DE CONVERSION	
El microorganismo identificado bajo I anterior fue recibido por esta Autoridad Depositaria Internacional el (Fecha de depósito original) y una solicitud de convertir el depósito original a un depósito bajo el Tratado de Budapest fue recibida por esta el (Fecha de solicitud de conversión)	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizados(s): (firma ilegible) Fecha: 2004-10-05
Dirección: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	

¹ Cuando aplica la regla 6.4(d), tal fecha es la fecha en la cual el estado de la autoridad depositaria internacional fue adquirido.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS CON PROPOSITOS DE
PROCEDIMIENTO DE PATENTE

FORMULARIO INTERNACIONAL

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim
F. Hoffman – La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffman – La Roche Inc,
340 Kingsland Street
Nutley, NJ 07110-1199, USA

DECLARACION DE VIABILIDAD
emitida conforme a la Regla 10.2
por la AUTORIDAD DEPOSITARIA
INTERNACIONAL, identificada al
final de esta página

I. DEPOSITANTE		II. IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
Nombre: Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim Dirección: F. Hoffman – La Roche AG 124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel Hoffman – La Roche Inc. 340 Kingsland Street Nutley, NJ 07110-1199, USA		Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: DSM ACC2686 Fecha del depósito o la transferencia ¹ : 2004-09-02	
II. DECLARACION DE VIABILIDAD			
La viabilidad del microorganismo identificado bajo II anterior fue probada el 2004-09-08 ² . (X) ³ viable () ³ no viable más			
IV. CONDICIONES BAJO LAS CUALES SE REALIZO LA PRUEBA DE VIABILIDAD ⁴			
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL			
Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Dirección: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizados(s): (firma ilegible) Fecha: 2004-10-05	

¹ Indicar la fecha del depósito original, o cuando se ha hecho una nuevo depósito o transferencia, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

² En los casos referidos en la Regla 10.2(a) (ii) y (iii), referirse a la prueba de viabilidad más reciente.

³ Marque con una equis la casilla aplicable

⁴ Llene si la Información ha sido requerida y si los resultados de la prueba fueron negativos

98

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

43
DSMZ

Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH

INTERNATIONAL FORM

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340, Kingsland Street
Nutley, NJ 07110-1199, USA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: hu-Mab<hOx40L>LC.010	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2686
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2004-09-02 (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): V. Wechs Date: 2004-10-05

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340, Kingsland Street
Nutley, NJ 07110-1199, USA

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM			
Name: Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim Address: F. Hoffmann-La Roche AG 124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel Hoffmann-La Roche Inc. 340, Kingsland Street Nutley, NJ 07110-1199, USA		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2686 Date of the deposit or the transfer ¹ : 2004-09-02			
III. VIABILITY STATEMENT					
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2004-09-06 ² . On that date, the said microorganism was (X) ³ viable () ³ no longer viable					
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴					
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY					
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): V. Weils Date: 2004-10-05			

- ¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS CON PROPOSITOS DE
PROCEDIMIENTO DE PATENTE

FORMULARIO INTERNACIONAL

Roche Diagnostics GmbH

Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim

F. Hoffman – La Roche AG

124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel

Hoffman – La Roche Inc,

340 Kingsland Street

Nutley, NJ 07110-1199, USA

RECIBO EN EL CASO DE UN
DEPOSITO ORIGINAL, emitido
conforme a la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA
INTERNACIONAL, identificada al
final de esta página

1. IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
Referencia de Identificación dada por el DEPOSITANTE: hu-Mab<hOx40L>LC.029	Número de Acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: DSM ACC2688
II. DESCRIPCION CIENTIFICA Y/O DESIGNACION TAXONOMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo I, anterior estaba acompañado por: () una descripción científica () una designación taxonómica propuesta (marque con una X si es aplicable)	
III. RECIBO Y ACEPTACION	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I, anterior, que fue recibido por esta el 2004-09-02 (fecha del depósito original) ¹ .	
IV. RECIBO Y SOLICITUD DE CONVERSION	
El microorganismo identificado bajo I anterior fue recibido por esta Autoridad Depositaria Internacional el (Fecha de depósito original) y una solicitud de convertir el depósito original a un depósito bajo el Tratado de Budapest fue recibida por esta el (Fecha de solicitud de conversión)	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Dirección: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizados(s): (firma legible) Fecha: 2004-10-05

¹ Cuando aplica la regla 6.4(d), tal fecha es la fecha en la cual el estado de la autoridad depositaria internacional fue adquirido.

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS CON PROPOSITOS DE
PROCEDIMIENTO DE PATENTE**

FORMULARIO INTERNACIONAL

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim
F. Hoffman – La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffman – La Roche Inc,
340 Kingsland Street
Nutley, NJ 07110-1199, USA

DECLARACION DE VIABILIDAD
emitida conforme a la Regla 10.2
por la AUTORIDAD DEPOSITARIA
INTERNACIONAL, identificada al
final de esta página

I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO
Nombre: Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim Dirección: F. Hoffman – La Roche AG 124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel Hoffman – La Roche Inc. 340 Kingsland Street Nutley, NJ 07110-1199, USA	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: DSM ACC2688 Fecha del depósito o la transferencia¹: 2004-09-02
II. DECLARACION DE VIABILIDAD	
La viabilidad del microorganismo identificado bajo II anterior fue probada el 2004-09-08 ² .	
☒ ³ viable ☐ ³ no viable más	
IV. CONDICIONES BAJO LAS CUALES SE REALIZO LA PRUEBA DE VIABILIDAD⁴	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Dirección: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizados(s): (firma ilegible) Fecha: 2004-10-05

¹ Indicar la fecha del depósito original, o cuando se ha hecho una nuevo depósito o transferencia, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

² En los casos referidos en la Regla 10.2(a) (ii) y (iii), referirse a la prueba de viabilidad más reciente.

³ Marque con una equis la casilla aplicable

⁴ Llene si la información ha sido requerida y si los resultados de la prueba fueron negativos

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

47
DSMZ

Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH

INTERNATIONAL FORM

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340, Kingsland Street
Nutley, NJ 07110-1199, USA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: hu-Mab<hOx40L>LC.029	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2688
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2004-09-02 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above was received by this International Depositary Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): V. Weiz Date: 2004-10-05

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

Form DSMZ-BP/4 (sole page) 12/2001

80

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

48
DSMZ

Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH

INTERNATIONAL FORM

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340, Kingsland Street
Nutley, NJ 07110-1199, USA

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM			
Name:	Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2688 Date of the deposit or the transfer ¹ : 2004-09-02			
Address:	F. Hoffmann-La Roche AG 124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel Hoffmann-La Roche Inc. 340, Kingsland Street Nutley, NJ 07110-1199, USA				
III. VIABILITY STATEMENT					
The viability of the microorganism identified under II above was tested on		2004-09-06			
On that date, the said microorganism was					
☒ viable					
☐ no longer viable					
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ²					
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY					
Name:	DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): V. Wicks Date: 2004-10-05			
Address:	Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig				

- ¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS CON PROPOSITOS DE
PROCEDIMIENTO DE PATENTE

FORMULARIO INTERNACIONAL

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim
F. Hoffman – La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffman – La Roche Inc,
340 Kingsland Street
Nutley, NJ 07110-1199, USA

RECIBO EN EL CASO DE UN
DEPOSITO ORIGINAL, emitido
conforme a la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA
INTERNACIONAL, identificada al
final de esta página

1. IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
Referencia de Identificación dada por el DEPOSITANTE: hu-Mab<hOx40L>LC.033	Número de Acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: DSM ACC2689
II. DESCRIPCION CIENTIFICA Y/O DESIGNACION TAXONOMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo I, anterior estaba acompañado por: () una descripción científica () una designación taxonómica propuesta (marque con una X si es aplicable)	
III. RECIBO Y ACEPTACION	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I, anterior, que fue recibido por esta el 2004-09-02 (fecha del depósito original) ¹ .	
IV. RECIBO Y SOLICITUD DE CONVERSION	
El microorganismo identificado bajo I anterior fue recibido por esta Autoridad Depositaria Internacional el (Fecha de depósito original) y una solicitud de convertir el depósito original a un depósito bajo el Tratado de Budapest fue recibida por esta el (Fecha de solicitud de conversión)	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Dirección: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizados(s): (firma ilegible) Fecha: 2004-10-05

¹ Cuando aplica la regla 6.4(d), tal fecha es la fecha en la cual el estado de la autoridad depositaria internacional fue adquirido.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS CON PROPOSITOS DE
PROCEDIMIENTO DE PATENTE

FORMULARIO INTERNACIONAL

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim
F. Hoffman – La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffman – La Roche Inc,
340 Kingsland Street
Nutley, NJ 07110-1199, USA

DECLARACION DE VIABILIDAD
emitida conforme a la Regla 10.2
por la AUTORIDAD DEPOSITARIA
INTERNACIONAL, identificada al
final de esta página

I. DEPOSITANTE		II. IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
Nombre: Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim Dirección: F. Hoffman – La Roche AG 124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel Hoffman – La Roche Inc. 340 Kingsland Street Nutley, NJ 07110-1199, USA		Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: DSM ACC2689 Fecha del depósito o la transferencia ¹ : 2004-09-02	
II. DECLARACION DE VIABILIDAD			
La viabilidad del microorganismo identificado bajo II anterior fue probada el 2004-09-06 ² . (X) ³ viable () ³ no viable más			
IV. CONDICIONES BAJO LAS CUALES SE REALIZO LA PRUEBA DE VIABILIDAD ⁴			
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL			
Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Dirección: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizados(s): (firma ilegible) Fecha: 2004-10-05	

¹ Indicar la fecha del depósito original, o cuando se ha hecho una nuevo depósito o transferencia, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).
² En los casos referidos en la Regla 10.2(a) (ii) y (iii), referirse a la prueba de viabilidad más reciente.
³ Marque con una equis la casilla aplicable
⁴ Llene si la información ha sido requerida y si los resultados de la prueba fueron negativos



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340, Kingsland Street
Nutley, NJ 07110-1199, USA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: hu-Mab<hOx40L>LC.033	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2689
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2004-09-02 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 2004-10-05

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

52



INTERNATIONAL FORM

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340, Kingsland Street
Nutley, NJ 07110-1199, USA

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM			
Name: Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim Address: F. Hoffmann-La Roche AG 124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel Hoffmann-La Roche Inc. 340, Kingsland Street Nutley, NJ 07110-1199, USA		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2689 Date of the deposit or the transfer ¹ : 2004-09-02			
III. VIABILITY STATEMENT					
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2004-09-06 ² . On that date, the said microorganism was (X) ³ viable () ³ no longer viable					
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴					
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY					
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): U. Wehls Date: 2004-10-05			

- ¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

55

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

PCT

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

(Capítulo II del Tratado de Cooperación de Patentes)

(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente 22672 WO-SR	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Forma PCT/IPEA/416																	
Solicitud Internacional No. PCT/EP2005/009968	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 16.09.2005	Fecha de prioridad (día/mes/año) 17.09.2004																
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC INV. C07K16/46																		
Solicitante F. HOFFMANN-LA ROCHE AG et al.																		
1. Este reporte es el reporte de examen preliminar internacional, establecido por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y transmitido al solicitante de conformidad con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consta de un total de 18 hojas, incluyendo esta carátula. 3. Este reporte también es acompañado por ANEXOS, que comprenden: a. ☐ (enviado al solicitante y a la Oficina Internacional) un total de hojas, como sigue: ☐ hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos los cuales han sido modificados y son la base de este reporte y/o hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas). ☐ hojas que reemplazan hojas anteriores, pero las cuales esta Autoridad considera que contienen una modificación que va más allá de la revelación en la solicitud internacional como se presentó, como se indicó en el ítem 4 de la Casilla No. I y la Casilla Suplementaria. b. ☐ (enviado únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y número de medio(s) electrónico(s)) , que contienen un listado de secuencias y/o tablas con ello, únicamente en una forma legible en computador, como se indicó en la Casilla Suplementaria Relacionada con el Listado de Secuencias (ver Sección 802 de las Instrucciones Administrativas).																		
4. Este reporte contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: <table border="0"> <tr> <td>☒ Casilla No. I</td> <td>Bases del Reporte</td> </tr> <tr> <td>☐ Casilla No. II</td> <td>Prioridad</td> </tr> <tr> <td>☒ Casilla No. III</td> <td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial.</td> </tr> <tr> <td>☒ Casilla No. IV</td> <td>Falta de unidad de invención</td> </tr> <tr> <td>☒ Casilla No. V</td> <td>Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación.</td> </tr> <tr> <td>☐ Casilla No. VI</td> <td>Ciertos documentos citados</td> </tr> <tr> <td>☐ Casilla No. VII</td> <td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td> </tr> <tr> <td>☐ Casilla No. VIII</td> <td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td> </tr> </table>			☒ Casilla No. I	Bases del Reporte	☐ Casilla No. II	Prioridad	☒ Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial.	☒ Casilla No. IV	Falta de unidad de invención	☒ Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación.	☐ Casilla No. VI	Ciertos documentos citados	☐ Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional	☐ Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional
☒ Casilla No. I	Bases del Reporte																	
☐ Casilla No. II	Prioridad																	
☒ Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial.																	
☒ Casilla No. IV	Falta de unidad de invención																	
☒ Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación.																	
☐ Casilla No. VI	Ciertos documentos citados																	
☐ Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional																	
☐ Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional																	
Fecha de presentación de la demanda 23.03.2006	Fecha de terminación de este reporte 20.10.2006																	
Nombre y dirección de correo de la Autoridad de examen preliminar internacional European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 -0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399-4465	Funcionario autorizado Celler, Jakob Teléfono No. +49 89 2399-																	

**REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE
PATENTABILIDAD**

Solicitud internacional No.
PCT/EP2005/009968

54

Casilla No. I Bases del reporte

1. Respecto al idioma, este reporte se basó en

- ☒ la solicitud internacional en el idioma en el cual fue presentada
- ☐ una traducción de la solicitud internacional en, el idioma, el cual es el idioma de una traducción suministrada para los propósitos de:
- ☐ búsqueda internacional (según la Regla 12.3(a) y 23.1 (b)).
 - ☐ publicación de la solicitud internacional (según la Regla 12.4(a))
 - ☐ examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2(a) y/o 55.3(a))

2. Respecto a los elementos de la solicitud internacional, este reporte se basa en (Páginas de remplazo que han sido suministradas a la oficina receptora en respuesta a una invitación bajo el artículo 14 están referenciados en este reporte como "presentados originalmente" y no están anexos a este reporte):

Descripción, Páginas

1-68 como se presentaron originalmente

Listado de Secuencias parte de la descripción, Páginas

1-50 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, Números

1-46 como se presentaron originalmente

Dibujos, Hojas

1/10-10/10 como se presentaron originalmente

☒ la secuencia numerada y/o alguna tabla(s)-ver Casilla Suplementaria a la Secuencia Numerada

3. ☐ Las modificaciones resultaron en la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/figuras
- ☐ listado de secuencia (especificar)
- ☐ cualquier tabla(s) relacionadas con la serie de listados (especificar)

4. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (alguno de) los anexos corregidos a este reporte y numerado antes no ha sido hecho, desde que ellos han sido considerados a través de la presentación original, como esta indicado en la casilla suplementaria (regla 70.2(c)).

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/figuras
- ☐ secuencia que enumera (especificar)
- ☐ algunas tabla(s) relatando secuencia numerada (especificar)

*si el Item 4 aplica, algunas o todas aquellas hojas pueden ser marcadas "reemplazadas"

55

Casilla No. III. No establecimiento de opinión respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

1. Las cuestiones de si la invención reivindicada parece ser novedosa, involucrar nivel inventivo (ser no obvia) o ser industrialmente aplicable no han sido examinadas respecto a:

- ☐ toda la solicitud internacional
- ☒ las reivindicaciones Nos. 35(IA)

porque:

- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 35 se relacionan con la siguiente materia objeto las cuales no requieren examen preliminar internacional (*especificar*):
ver hoja separada

- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos. son tan imprecisas que no pudo formarse una opinión significativa (*especifique*):

- ☐ las reivindicaciones o dichas reivindicaciones Nos. están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa.

- ☐ no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos.

- ☐ no pudo establecerse una opinión significativa sin el listado de secuencia, el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no:

- ☐ suministró un listado de secuencias en papel para cumplir con el estándar para ello provisto en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicho listado no estuvo disponible para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.

- ☐ suministró un listado de secuencias en formato electrónico para cumplir en el estándar para ello provisto en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas y tal listado no estuvo disponible para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.

- ☐ pagó la tarifa de suministro tardío para el suministro de un listado de secuencia en respuesta a una invitación de acuerdo con las Reglas 13ter.1(a) o (b) y 13ter.2.

- ☐ no pudo establecerse una opinión significativa sin las tablas relacionadas con los listados de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no suministró dichas tablas en formato electrónico para cumplir con los requisitos técnicos para ello provistos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas y dichas tablas no estuvieron disponibles para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.

- ☐ las tablas que se relacionan con el listado de secuencias de aminoácidos y/o nucleótidos, si están solamente en formato electrónico, no cumplen con los requisitos técnicos para ello provistos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

- ☐ Ver hoja separada para detalles adicionales

56

REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
SOBRE PATENTABILIDAD

Casilla No. IV Falta de unidad de invención

1. ☒ En respuesta a la invitación para restringir o pagar derechos adicionales el solicitante ha dentro del límite de tiempo aplicable:
- ☐ restringido las reivindicaciones.
 - ☐ pagado derechos adicionales.
 - ☒ pagado derechos adicionales bajo protesta y, donde aplican los derechos de protesta.
 - ☐ pagado derechos adicionales bajo protesta pero la aplicación de los derechos para protesta no se pagó.
 - ☐ ni restringido ni pagado derechos adicionales.
2. ☐ Esta Autoridad encontró que el requisito de unidad de invención no se ha cumplido y escogió, de conformidad con la Regla 68.1, no invitar al solicitante para que restrinja o pague derechos adicionales.
3. ☒ Esta Autoridad considera que el requisito de unidad de invención de acuerdo con las Reglas 13.1, 13.2 y 13.3 es
- ☐ se ha cumplido.
 - ☒ no se ha cumplido por las siguientes razones:
ver hoja separada
4. Por consiguiente, este reporte se ha establecido con respecto a las siguientes partes de la solicitud internacional:
- ☒ Todas las partes.
 - ☐ Las partes que se relacionan con las reivindicaciones Nos.

Casilla No. V Afirmación razonada bajo el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Afirmación

Novedad (N)	Sí: Reivindicaciones 1-14, 19, 24-31, 40-46
	No: Reivindicaciones 15-18, 20-23, 32-39
Nivel inventivo (IS)	Sí: Reivindicaciones 9
	No: Reivindicaciones 1-8, 10-46
Aplicabilidad industrial (IA)	Sí: Reivindicaciones 1-34, 36-46
	No: Reivindicaciones

2. Citaciones y explicaciones (Regla 70.7):

ver hoja separada

57

57

Solicitud internacional No.

**REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
SOBRE PATENTABILIDAD**

PCT/EP2005/009968

Casilla Suplementaria relacionada con el Listado de Secuencias

Continuación de la Casilla I, ítem 2:

1. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:

a. tipo de material:

- ☒ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

b. formato de material:

- ☒ en papel
☒ en formato electrónico

c. tiempo de presentación/suministro:

- ☒ contenido en la solicitud internacional según se registró
☒ registrada junto con la solicitud internacional en formato electrónico
☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para propósitos de búsqueda y/o evaluación.
☐ recibido por esta Autoridad como una recomendación* en

2. ☐ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla(s) relacionada(s) con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

3. Comentarios adicionales:

* Si el ítem 4 en la casilla No. I aplica, el listado y/o tablas relacionadas con ello. que forman parte de la base del soporte, puede ser marcada "reemplazada"

de

**REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL
SOBRE PATENTABILIDAD
(HOJA SEPARADA)**

Solicitud internacional No.

PCT/EP2005/009968

Re ítem III

No establecimiento de opinión con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial

La reivindicación 35 se relaciona con la materia objeto considerada por esta Autoridad como cubierta por las provisiones de la Regla 67.1(iv) PCT. En consecuencia, no se formulará opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(i) PCT).

Para la evaluación de la presente reivindicación 35 acerca de la pregunta si son aplicables industrialmente, no existe un criterio unificado en los Estados Contratantes de PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable la materia objeto de las reivindicaciones para el uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero pueden permitir, sin embargo, reivindicaciones a un compuesto conocido para primer uso en tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

Re ítem IV

Falta de unidad de invención

La presente solicitud de patente internacional contiene 1-48 reivindicaciones.

Entre ese conjunto de reivindicaciones hay 8 reivindicaciones independientes, encabezando los grupos de las siguientes materias objeto.

1. Reivindicaciones 1-14, 16-21 (parcialmente), 25-39 (parcialmente), que están todas caracterizadas por la materia objeto común de las reivindicaciones 1, p.e., un anticuerpo caracterizado en que se enlaza a OX40L, contiene una parte de Fc derivada de origen humano y no se enlaza al factor de complemento Clq.

2. Reivindicaciones 15, 16-21 (parcialmente), 25-39 (parcialmente), que están todas caracterizadas por la materia objeto común de la reivindicación 15, p.e., un anticuerpo caracterizado porque dicho anticuerpo se enlaza a OX40L, y comprende una combinación de región variable seleccionada independientemente de los grupos de secuencias de regiones variables

proporcionadas en la lista bajo los puntos a-l, que relacionan las SEQ ID NOS: 1-12, 16-20

3. Reivindicaciones 22, 23, 25-39 (parcialmente), que están todas caracterizadas por la materia objeto común de la reivindicación 22, p.e., un anticuerpo que se enlaza a OX40L, que comprende una cadena ligera variable y una cadena pesada variable, caracterizado porque la cadena pesada variable comprende CDR3 seleccionado de una lista de SEQ ID NOS: 33-38 y/o la cadena ligera variable comprende CDR3 seleccionado de SEQ ID NOS: 51-57

4. Reivindicaciones 24-25-35 (parcialmente), 39 (parcialmente) que están todas caracterizadas por la materia objeto común de la reivindicación 24, p.e., un anticuerpo que se produce mediante una línea celular seleccionada del grupo proporcionado en la reivindicación.

De acuerdo con la descripción, página 24, líneas 21-24, dichas líneas celulares producen anticuerpos que son útiles como intermediarios para la generación de anticuerpos caracterizados por que no se enlazan al factor de complemento C1q y/o no se enlaza al receptor gama Fc humano. A la luz de la descripción, como se citó anteriormente, es obvio que los anticuerpos como están definidos en el grupo de reivindicaciones encabezadas por la reivindicación 24 no están per se caracterizados por no enlazar en factor de complemento C1q.

5. La reivindicación 40 está dirigida a un método para modificar la secuencia de amino ácido inicial de una CDR de cadena pesada de anticuerpo base caracterizada por la SEQ ID NOS: 21-38 y/o una CDR de cadena ligera de anticuerpo base caracterizada por la SEQ ID NOS: 39-57, mediante la modificación de la secuencia de ácido nucleico codificadora con el fin de modificar 1 amino ácido en la CDR de cadena pesada, 1-2 amino ácidos en la CDR2 de cadena pesada, 1-2 amino ácidos en la CDR3 de cadena pesada, 1-3 amino ácidos en la CDR1 de cadena ligera, 1-3 amino ácidos en la CDR2 de cadena ligera, y/o 1-3 amino ácidos en la CDR3 de cadena ligera, expresando dichas secuencias modificadas en una estructura de anticuerpo, y midiendo si dicho anticuerpo se enlaza a OX40L con un valor dado de KD.

6. Las reivindicaciones 41, 42, que están caracterizadas por la materia objeto común de la reivindicación 42, p.e., un anticuerpo que se enlaza a OX40L, es de clase IgG1 humano y comprende la cadena pesada gama de SEQ ID NOS: 58, 62 o 66.

7. Las reivindicaciones 43, 44, que están caracterizadas por la materia objeto común de la reivindicación 43, p.e., un anticuerpo que se enlaza a

**REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL
SOBRE PATENTABILIDAD
(HOJA SEPARADA)**

Solicitud internacional No.
PCT/EP2005/009968

OX40L, es de clase IgG1 humano y contiene la mutación L234A/L235A y comprende como cadena pesada gama la SEQ ID NOS: 59, 63 o 67.

8. Las reivindicaciones 45, 46, que están caracterizadas por la materia objeto común de la reivindicación 45, p.e., un anticuerpo que se enlaza a OX40L, es de clase IgG4 humano y contiene la mutación S228P y comprende como cadena pesada gama las SEC ID NOS: 60, 64 o 68.

Se nota que los grupos de materias objeto identificadas bajo los puntos 2, 3, 5-8 anteriores, que relacionan las SEQ ID NOS, no tienen ninguna SEQ ID NOS en común, por lo tanto dichas SEQ ID NOS no representan ninguna característica técnica común entre dichos grupos de materias objeto.

Más aún, de acuerdo con la presente descripción, página 15, el enlace del anticuerpo a C1q es causado por los sitios de enlace definidos en la parte de Fc. Tales sitios de enlace son conocidos en el estado de la técnica (líneas 2-5). Los anticuerpos de las sub-clases IgG1, IgG2 e IgG3 usualmente muestran enlace a C1q, mientras que IgG4 no se enlaza a IgG4 (líneas 12-14). La expresión "parte de Fc derivada de origen humano y no se enlaza al C1q de complemento" denota que la parte de Fc que es una parte de Fc de anticuerpo humano de la subclase IgG4 o parte de Fc de otras subclases, que es modificado de tal modo que no se enlaza a C1q (líneas 15-19). Las más preferidas son las partes de Fc que comprenden las regiones constantes de cadena pesada con mutaciones L234A y L235A (líneas 24-27).

A la luz de la información anterior proporcionada por la presente descripción, la característica técnica de las reivindicaciones 1, que caracteriza el grupo de materias objeto definidas bajo el punto 1, anterior: "contiene una parte de Fc derivada de origen humano y no se enlaza al factor de complemento C1q", representa una característica técnica que es equivalente a la característica técnica del grupo de materias objeto definidas bajo el punto 8 anterior: "Es de clase IgG4 humana" y a la característica técnica del grupo de materias objeto definidas bajo el punto 7 anterior: "es de clase IgG1 humana y contiene la mutación L234A/L235A". Ninguno de los grupos restantes de las materias objeto definidas bajo los puntos 2-6 anteriores, está caracterizado por ninguna de estas tres características o cualquiera equivalente a esta.

En consecuencia, solo hay una característica técnica en común para todas las reivindicaciones: "un anticuerpo caracterizado en que se enlaza a OX40L".

El documento de la técnica previa Nohara et al., 2001, revela anticuerpo anti-OX40L monoclonal y el uso de este para bloquear la interacción de dicho ligando con el receptor cognado como una herramienta en el alivio de enfermedad autoinmune experimental (Resumen).

En vista de esa revelación de la técnica previa, el problema técnico objetivo que subyace la presente invención puede ser formulado como la provisión de anticuerpos anti-OX40L adicionales y métodos adicionales para generar dichos anticuerpos adicionales. Las presentes reivindicaciones están dirigidas a un número de tales anticuerpos y métodos adicionales.

Como se discutió anteriormente, la única característica técnica común compartida por todas las reivindicaciones en un anticuerpo anti-OX40L. Sin embargo, en vista de la técnica previa anterior, dicho anticuerpo no representa una contribución sobre la técnica previa, porque tal anticuerpo no es nuevo.



En consecuencia, las materias objeto de las presentes reivindicaciones fueron subdivididas en el estado de la búsqueda en grupos independientes teniendo en cuenta rasgos técnicos adicionales que caracterizan tales anticuerpos, cuyas características cumplen el requerimiento de la Regla 13.2 PCT, p.e., son comunes para todas las materias objeto de cada subgrupo y de antemano representan la contribución hecha sobre la técnica previa.

Las materias objeto 1, 7 y 8 anteriores, comparten la característica técnica de la reivindicación 1: "contiene una parte de Fc derivada de origen humano y no se enlaza al factor de complemento C1q", porque, esa caracteriza en el objeto 7 y 8 está reflejada por rasgos técnicos equivalentes en la forma de mutaciones específicas, como se discutió anteriormente. En consecuencia, las materias objeto 1, 7 y 8 forman un grupo de invenciones que tienen dicha característica técnica en común.



Las materias objeto 2, 3, 5 y 6 están caracterizadas por SEQ ID NOS, sin embargo, dichas SEQ ID NOS no se superponen entre dichas materias objeto, por lo tanto, cada materia objeto no tiene ninguna característica técnica específica con las otras materias objeto en común. Por lo tanto, hay una falta de "característica técnica especial" común y dichas materias objeto no son unitarias. La materia objeto del punto 4 tampoco comparte ninguna característica técnica específica con el resto de las materias objeto y también representa una materia objeto no unitaria, separada.

Como el solicitante pagó honorarios de búsqueda adicionales, el Reporte de

62

**REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL
SOBRE PATENTABILIDAD
(HOJA SEPARADA)**

Solicitud internacional No.

PCT/EP2005/009968

Búsqueda Internacional y la presente opinión escrita se relacionadas con las 6 invenciones como se identificaron anteriormente, en donde las materias objeto que forman el grupo de invenciones mencionado primero en las reivindicaciones, p.e., materias objeto definidas bajo los puntos 1, 7 y 8 anteriores.

Re Item V

Declaración Razonada con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicabilidad Industrial; citaciones o explicaciones que soportan dicha declaración

La presente solicitud de patente Internacional se relaciona con un anticuerpo caracterizado en que se enlaza a OX40L, contiene una parte de Fc derivada de origen humano y no se enlaza al factor de complemento C1q, un anticuerpo caracterizado porque dicho anticuerpo se enlaza a OX40L, y comprende una combinación de región variable seleccionada independientemente de los grupos de secuencias de regiones variables proporcionadas en la lista bajo los puntos a-l, que relacionan las SEQ ID NOS: 1-12, 16-20, un anticuerpo que se enlaza a OX40L, que comprende una cadena ligera variable y una cadena pesada variable, caracterizado porque la cadena pesada variable comprende CDR3 seleccionado de una lista de SEQ ID NOS: 33-38 y/o la cadena ligera variable comprende CDR3 seleccionado de SEQ ID NOS: 51-57, un anticuerpo que se produce mediante una línea celular seleccionada del grupo proporcionado en la reivindicación 23, un método para modificar la secuencia de amino ácido inicial de una CDR de cadena pesada de anticuerpo base caracterizada por la SEQ ID NOS: 21-38 y/o una CDR de cadena ligera de anticuerpo base caracterizada por la SEQ ID NOS: 39-57, mediante la modificación de la secuencia de ácido nucleico codificadora con el fin de modificar 1 amino ácido en la CDR de cadena pesada, 1-2 amino ácidos en la CDR2 de cadena pesada, 1-2 amino ácidos en la CDR3 de cadena pesada, 1-3 amino ácidos en la CDR1 de cadena ligera, 1-3 amino ácidos en la CDR2 de cadena ligera, y/o 1-3 amino ácidos en la CDR3 de cadena ligera, expresando dichas secuencias modificadas en una estructura de anticuerpo, y midiendo si dicho anticuerpo se enlaza a OX40L con un valor dado de KD, así como, un anticuerpo que se enlaza a OX40L, es de clase IgG1 humano y comprende la cadena pesada gama de SEQ ID NOS: 58, 62 o 66, un anticuerpo que se enlaza a OX40L, es de clase IgG1 humano y contiene la mutación L234A/L235A y comprende como cadena pesada gama las SEC ID NOS: 59, 63 o 67 y un anticuerpo que se enlaza a OX40L, es de clase IgG4 humano y contiene la mutación S228P y comprende como cadena pesada gama las SEC ID NOS: 60, 64 o 68.

63

Las numerosas materias objeto de las reivindicaciones no forman el grupo unitario de invenciones en el sentido de la regla 13 PCT (para detalles ver punto Re Item IV, anterior y el razonamiento para la falta de unidad unida al ISR)

Invencción

Reivindicaciones 1-14, 16-21 (parcialmente), 25-39 (parcialmente), 43-46.

En vista del hecho que la invención mencionada primero en las reivindicaciones está caracterizada por la característica técnica de la reivindicación 1: "contiene una parte de Fc derivada de origen humano y no se enlaza al factor de complemento C1q", o las características técnicas equivalentes de las reivindicaciones 43 y 45, se tiene en consideración el documento de la técnica previa WO9958572.

Dicho documento revela una molécula de polipéptido que contiene un dominio de enlace capaz de enlazarse a una molécula objetivo, y un dominio efector que tiene una secuencia de amino ácido basada en la cadena pesada de la inmunoglobulina humana, caracterizada en que la molécula de enlace es capaz de enlazarse a una molécula objetivo sin desencadenar una lisis dependiente de complemento significativa, o destrucción mediada por células el objetivo (página 7, líneas 15-24). Más aún, en la página 9, líneas 10-13, se declara que la inhabilidad de desencadenar una lisis de complemento significativa es el resultado de la afinidad reducida para la molécula C1q.

Las modificaciones específicas en la cadena pesada de inmunoglobulina humana que produce dicha disminución en la lisis de complemento están reveladas, inter alia, en la página 10, e incluyen una sustitución del amino ácidos en la posición 235 a alanina. Dicha sustitución por alanina está en la mismos posición que la sustitución por alanina de la presente reivindicación 43.

En las páginas 17-24 se proveen ejemplos de enfermedades en donde se usa la molécula de esa revelación, que se enlaza a moléculas objetivo, pero no activa el complemento (ver comentario en la página 24, líneas 1-24).

Varlas inmunoglobulinas mutantes basadas en IgG1, IgG2 o IgG4 están reveladas y se demostró que tienen las propiedades deseadas (página 10, líneas 29-31).

Ejemplos específicos de las moléculas de esa invención se proveen como serie de anticuerpos CAPATH-1 (página 44, ff). En las páginas 4-7 se provee la consideración general de porqué las propiedades mediadas por Fc, tales como activación de complemento es inapropiada en situaciones clínicas que involucran el tratamiento con anticuerpo.

La diferencia entre los contenidos de esa revelación y las materias objeto de

las reivindicaciones independientes presentes 1, 43 y 45, en el sentido más general, es el hecho que dicha revelación de la técnica previa no revela directamente a la molécula de enlace a OX40L.

En consecuencia, el problema técnico objetivo a la luz de esa revelación podría ser formulada como la provisión de moléculas adicionales que comprenden un dominio de enlace objetivo y dominio derivado de la cadena pesada de inmunoglobulina humana, que se caracteriza en que no activa el complemento debido al enlace disminuido de C1q, para uso clínico y los métodos para generar las mismas.

El potencial del uso clínico de anticuerpos monoclonales de ligando anti-OX40L es conocido en la técnica previa, tal como la revelación de Nohara et al. (2001). Además, en la presente descripción se reconoce en las páginas 1-2 que estaba documentado en numerosas revelaciones que dichos anticuerpos anti-OX40L tienen aplicaciones clínicas potencialmente importantes.



Por lo tanto, en vista de la revelación de WO9958572 en combinación con el hecho que los anticuerpos monoclonales anti-OX40L estaban contemplados en la técnica previa para una variedad de aplicaciones clínicas (p.e., Nohara et al), se llegaría a los anticuerpos caracterizados por las características técnicas de las reivindicaciones 1-4, 7, 11-13, 19 sin aporte inventivo, que hace a dichas reivindicaciones no inventivas (Art. 33.3 PCT).

Más aún, la revelación de la técnica previa por Hezare et al., 2001, enseña que hay mutaciones adicionales en la región Fc de anticuerpos que conducen a la eliminación del enlace de C1q y la activación del complemento (Resumen). Dichas mutaciones son: K322A, L234A/L235A. Aunque la última revelación se relaciona con anticuerpos anti-VIH-1 solamente, en vista de la enseñanza extensiva de WO9958572 con respecto a la importancia de obtener anticuerpos con propiedades modificadas, el experto que trabaje en el campo de la provisión de anticuerpos para uso clínico con activación de complemento eliminada, estaría conciente de dicha revelación y vería la aplicabilidad general de dichas mutaciones para la provisión de anticuerpos adicionales para uso clínico. En vista de la información anterior de la técnica previa, las mutaciones específicas de las reivindicaciones 7, 8, 10-13, 43-44 no representan una contribución sobre la técnica previa (Art. 33.3 PCT).



Con respecto a los rasgos técnicos de las reivindicaciones 5, 6, 14, 16-21, 28-39, 43-46, que están representados, por ejemplo, por valores KD, valores IC50 específicos o SEQ ID NOS específicas, de regiones variables o regiones constantes, u otra característica técnica obvia o usos, la siguiente observación aplica.

Dichas características técnicas específicas de esas reivindicaciones podrían hacer que la materia objeto para la cual se busca protección sea inventiva solamente si se demostrara que dichas características producen conveniencia inesperadamente aumentada de los anticuerpos para uso clínico específico o cualquier otro efecto inesperadamente ventajoso.

La revelación de la presente solicitud no provee ningún ejemplo de conveniencia inesperada de dichos anticuerpos para uso clínico. Los ejemplos 1-23 documentan la habilidad de los anticuerpos para enlazarse a OX40L y bloquear la Interacción de OX40L con el receptor cognado de una manera específica, que a su vez influencia la activación de célula T, así como la habilidad disminuida de enlazarse a C1q y activas el sistema de complemento. Estos ejemplos representan una cantidad sustancial de trabajo experimental. Sin embargo, esta cantidad sustancial de trabajo no parece tener carga indebida representada porque, el experto estaba enfrentado a una expectativa razonable de éxito en el comienzo, basado en la información de la técnica previa, como se discutió anteriormente.

El trabajo experimental fue solamente de naturaleza rutinaria y no produce ningún efecto inesperado. En consecuencia, no se puede reconocer la presencia de nivel inventivo en las reivindicaciones 5, 6, 14-18, 20-23, 43-46 basado en la información proporcionada en la solicitud (Art. 33.3 PCT).

Adicionalmente, el documento de la técnica previa WO9504588 revela moléculas quiméricas compuestas de dominio de enlace a anticuerpo originado de roedor específico para un objetivo, y una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia modificada con el fin de tener una función efectora particular (página 11, líneas 19-25). En donde dicha función efectora particular estará presente en un grado mayor o menor, que siempre es más apropiado para una utilidad particular de dicha molécula quimérica (página 12, líneas 10-13). Un ejemplo específico es la introducción de mutaciones específicas en la cadena pesada gama 1 del anticuerpo anti-CDw52 (página 18, líneas 22-25). Otro ejemplo es la molécula específica para OX40L (página 32-33, reivindicaciones 1 y 10).

En vista de las dos revelaciones anteriores de la técnica previa WO9504588 y WO9958572, el concepto de un anticuerpo que se enlaza a OX40L y contiene parte de Fc derivada de origen humano y no se enlaza al factor de complemento C1q, no representa una contribución sobre la técnica previa. Además, la característica técnica equivalente de la reivindicación 43, p.e., la sustitución por alanina en la posición 235 tampoco representa una contribución sobre la técnica previa.

66

**REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL
SOBRE PATENTABILIDAD
(HOJA SEPARADA)**

Solicitud internacional No.
PCT/EP2005/009968

En vista del análisis anterior, se vuelve obvio que la reivindicación 1 no es inventiva (Art. 33.3). La reivindicación Independiente 43 también carece de la presencia de nivel inventivo. Por lo tanto, el concepto común de las reivindicaciones 1, 43 y 45, que fue una visión anterior en la provisión de anticuerpos anti-OX40L caracterizados por activación de complemento disminuida, no representa una contribución sobre la técnica previa. Las características técnicas que subyacen dicho concepto común, p.e., "parte de Fc derivado de origen humano y no se enlaza al factor de complemento Cq1" o "que es de clase IgG1 que contiene la mutación L234A/L235A" no son nuevas o inventivas, respectivamente. En consecuencia, el grupo de materias objeto identificadas bajo los puntos 1, 7 y 8, que fue anteriormente considerado como unitario (ver Re Item IV y el razonamiento para la objeción de falta de unidad proporcionada con el ISR) no representa una contribución sobre la técnica previa. En consecuencia, hay una falta de "característica técnica especial" en el sentido de la Regla 13.2 PCT. Las materias objeto identificadas bajo los puntos 1, 7 y 8, constituyen un grupo de soluciones alternativas al problema técnico objetivo de la provisión de anticuerpos adicionales caracterizados por funciones efectoras cambiadas, como se definió anteriormente.

Como se discutió extensamente antes, no es obvio al presente cual de las numerosas materias objeto de los puntos anteriores, si la hay, está asociada con un efecto técnico especial que haría a su vez dicha materia objeto inventiva. En consecuencia, la lista exhaustiva de invenciones separadas no se provee con esta comunicación.

Sería factible establecer tal lista de materias objeto, solamente, si la contribución inventiva de cualquier elemento de la solicitud llegara a ser razonablemente establecido.

Además, el examen preliminar detallado, posterior, de materias objeto no unitarias adicionales, de la solicitud excede el marco de esta opinión escrita bajo el Capítulo I del PCT. Tal examen preliminar adicional podría ser obtenido por el solicitante, sin embargo, bajo las provisiones del Capítulo II del PCT, si el solicitante lo desea y paga los honorarios de examen preliminar adicional.

Invención II

Reivindicaciones 15, 16-21 (parcialmente), 25-30 (parcialmente)

66

**REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL
SOBRE PATENTABILIDAD
(HOJA SEPARADA)**

Solicitud internacional No.
PCT/EP2005/009968

La reivindicación 15 está dirigida a un anticuerpo caracterizado porque dicho anticuerpo se enlaza a OX40L, y que dicho anticuerpo comprende una combinación de región variable seleccionada independientemente de los grupos de secuencias de regiones variables proporcionadas en la lista bajo los puntos a) a l), como secuencias de amino ácido de SEQ ID NOS dadas.

Se nota que ninguno de los documentos citados de la técnica previa revela de una forma explícita las combinaciones de secuencias proporcionadas bajo los puntos a) a l) de la reivindicación 15. Sin embargo, Nohara et al, 2001, revela anticuerpos monoclonales anti-OX40L. Totzuka et al, 2003, también revela anticuerpos anti-OX40L. Además, Satake et al, 2000, revela anticuerpos anti-OX40L.



Es una materia de reconocimiento básico al experto que la especificidad del anticuerpo está determinada por la secuencia de amino ácido de las regiones variables. Como numerosos ejemplos de anticuerpos específicos para OX40L están descritos en la técnica previa sin revelar explícitamente la secuencia de amino ácido de la región variable, no es posible para el examinador dar la respuesta a la pregunta si los anticuerpos de la técnica previa están caracterizados por las secuencias de región variable de la reivindicación 15 en la ausencia de información adicional. En consecuencia, la novedad de la reivindicación 15 no puede ser reconocida en este momento. Es responsabilidad del solicitante definir la materia objeto para la cual se busca protección en términos de características técnicas, de forma que se distinga la materia objeto de las reivindicaciones de cualquier materia objeto de la técnica previa (Art. 33.2 en combinación con el Art. 6 PCT). En el presente caso, la carga para demostrar que los anticuerpos de la reivindicación 15 son virajes nuevos para el solicitante. Mientras no se proporcione evidencia positiva para mostrar que ninguno de los anticuerpos anti-OX40L de la técnica previa cae dentro de el alcance de la reivindicación 15, no se puede reconocer la novedad. El resto de reivindicaciones de este grupo de materias objeto define realizaciones obvias adicionales, por lo tanto, no se puede encontrar contribución inventiva entre dichas reivindicaciones (Art. 33.3 PCT).



Se llama la atención del solicitante aquí a que una nueva revelación de una secuencia o una parte de una secuencia de un anticuerpo no la hace nueva per se, incluso si dicha secuencia de un anticuerpo conocido no fue revelada anteriormente.

Se nota además que en vista del hecho que los anticuerpos anti-OX40L son conocidos en la técnica previa, el problema técnico objetivo que subyace el grupo de materias objeto encabezado por la reivindicación independiente 15 puede ser formulado como la provisión de anticuerpos anti-OX40L adicionales.

Dicho grupo de materias objeto está dirigido a un gran número de soluciones alternativas al problema técnico objetivo. Dicha solución no tiene ninguna característica estructural o funcional en común que representaría una contribución sobre la técnica previa, por lo tanto, existe una falta de unidad. Aquí se hace notar que la presencia de secuencias de amino ácido en regiones variables de anticuerpos no representa una contribución sobre la técnica previa per se. Con el fin de constituir un vínculo unitario a las materias objeto, las secuencias de amino ácidos de dichas regiones variables tendrían un elemento estructural o funcional común a ellas. Sin embargo, la reivindicación 15 no define tal elemento. Además, la provisión de tales anticuerpos adicionales sería realizada por el experto sin aporte inventivo. Para que estos anticuerpos sean considerados inventivos, se debe demostrar un efecto inesperado asociado con los mismos (Art. 33.3 PCT).

Invencción III

Reivindicaciones 22, 23, 25-39 (parcialmente),

La reivindicación 22 está dirigida a anticuerpos anti-OX40L caracterizados por secuencias de amino ácido específicas de CDR3 de cadena variable y/o ligera.

Los documentos de la técnica previa no revelan dichas secuencias CDR3 de anticuerpos anti-OX40L de manera explícita, sin embargo, como en el caso de la invención II, la técnica previa citada anteriormente revela anticuerpos anti-OX40L. Mientras no se provea evidencia que los anticuerpos anti-OX40L de la técnica previa no están caracterizados por las regiones CDR3 de la reivindicación 22, la novedad de dicha reivindicación no puede ser reconocida (Art. 33.2 PCT).

El problema técnico objetivo aquí también puede ser formulado como la provisión de anticuerpos anti-OX40L adicionales. En consecuencia, también hay una falta de unidad posterior. El grupo de materias objeto encabezadas por la reivindicación 22 está dirigido a un número de soluciones alternativas, que no están vinculadas por un concepto común que representa una contribución sobre la técnica previa, por lo tanto, estas son soluciones alternativas independientes. Además, la provisión de tales anticuerpos adicionales sería realizada por el experto sin aporte inventivo. Para que estos anticuerpos sean considerados inventivos, se debe demostrar un efecto inesperado asociado con los mismos (Art. 33.3 PCT).

Invencción IV

Reivindicaciones 24-25-35 (parcialmente), 39 (parcialmente)

La reivindicación 24 está dirigida a anticuerpo caracterizado en que se produce mediante una línea celular seleccionada de un grupo. En la descripción es claro que dichos anticuerpos están caracterizados por la habilidad de enlazarse a OX40L. Como estas líneas celulares no estaban reveladas en la técnica previa, la novedad de los anticuerpos es reconocida (Art. 33.2 PCT). Sin embargo, también aquí, el problema técnico objetivo es la provisión de anticuerpos anti-OX40L adicionales.

En vista de la técnica previa citada anteriormente, cada anticuerpo de este grupo también representa una solución alternativa y separada del problema técnico objetivo, entonces, existe falta de unidad. Además, la provisión de tales anticuerpos adicionales sería realizada por el experto sin aporte inventivo. Para que estos anticuerpos sean considerados inventivos, se debe demostrar un efecto inesperado asociado con los mismos (Art. 33.3 PCT). El resto de reivindicaciones de este grupo de materias objeto define realizaciones adicionales obvias, por lo tanto no se puede encontrar contribución inventiva entre dichas reivindicaciones (Art. 33.3 PCT).

Invencción V

La reivindicación 40, que está dirigida a un método para modificar la secuencia de amino ácido inicial de una CDR de cadena pesada de anticuerpo base caracterizada por la SEQ ID NOS: 21-38 y/o una CDR de cadena ligera de anticuerpo base caracterizada por la SEQ ID NOS: 39-57, mediante la modificación de la secuencia de ácido nucleico codificadora con el fin de modificar 1 amino ácido en la CDR de cadena pesada, 1-2 amino ácidos en la CDR2 de cadena pesada, 1-2 amino ácidos en la CDR3 de cadena pesada, 1-3 amino ácidos en la CDR1 de cadena ligera, 1-3 amino ácidos en la CDR2 de cadena ligera, y/o 1-3 amino ácidos en la CDR3 de cadena ligera, expresando dichas secuencias modificadas en una estructura de anticuerpo, y midiendo si dicho anticuerpo se enlaza a OX40L con un valor dado de KD.

La modulación de especificidad de enlace para anticuerpos mediante la mutación de regiones de CDR es conocida en la técnica previa, como lo ejemplifica Gram et al, 1992. La reivindicación 40 sugiere simplemente el método. La solicitud no provee ningún ejemplo específico para reducir el método a la práctica. En vista del hecho que la presente solicitud no documenta ningún ejemplo de anticuerpos anti-OX40L cuya especificidad sería mejorada mediante mutación de regiones de CDR, el concepto de aplicar mutaciones de CDR para mejorar la especificidad de enlace no tiene ningún

2

mérito inventivo (Art. 33.3 PCT). Las reivindicaciones restantes de este grupo de materias objeto definen realizaciones adicionales obvias, por lo tanto, no se puede encontrar contribución inventiva entre dichas reivindicaciones (Art. 33.3 PCT).

Inventión VI

Reivindicaciones 41, 42.

En vista del hecho que no se ha demostrado en la solicitud que la característica técnica de los anticuerpos de la reivindicación 41, p.e., que son de clase IgG1 humana, y que comprenden secuencias específicas de ID Nos., resuelve algún problema técnico específico, el problema técnico objetivo que subyace la materia objeto de la reivindicación 41 se puede considerar, de nuevo, como la provisión de anticuerpos anti-OX40L adicionales. Como se discutió extensamente con respecto a la Inventión I, los anticuerpos anti-OX40 son conocidos, y estaban contemplados para uso clínico en humanos. Así, la provisión de anticuerpos humanizados sería obvia. En consecuencia, las materias objeto de la Inventión VI carecen de presencia de nivel inventivo (Art. 33.3 PCT). El resto de reivindicaciones de este grupo de materias objeto definen realizaciones adicionales obvias, por lo tanto, no se puede encontrar contribución inventiva entre dichas reivindicaciones (Art. 33.3 PCT).

33

SI 600 226720
F. Hoffmann La Roche AG

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 22672 WO-SR	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEAA16																									
International application No. PCT/EP2005/009988	International filing date (day/month/year) 16.09.2005	Priority date (day/month/year) 17.08.2004																								
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C07K16/46																										
Applicant F.HOFFMANN-LA ROCHE AG et al.																										
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 18 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 807 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).																										
4. This report contains indications relating to the following items: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 10px;">☒</td> <td style="width: 100px;">Box No. I</td> <td>Basis of the report</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Box No. II</td> <td>Priority</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Box No. III</td> <td>Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Box No. IV</td> <td>Lack of unity of invention</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Box No. V</td> <td>Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Box No. VI</td> <td>Certain documents cited</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Box No. VII</td> <td>Certain defects in the international application</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Box No. VIII</td> <td>Certain observations on the international application</td> </tr> </table>			☒	Box No. I	Basis of the report	☐	Box No. II	Priority	☒	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	☒	Box No. IV	Lack of unity of invention	☒	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement	☐	Box No. VI	Certain documents cited	☐	Box No. VII	Certain defects in the international application	☐	Box No. VIII	Certain observations on the international application
☒	Box No. I	Basis of the report																								
☐	Box No. II	Priority																								
☒	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability																								
☒	Box No. IV	Lack of unity of invention																								
☒	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement																								
☐	Box No. VI	Certain documents cited																								
☐	Box No. VII	Certain defects in the international application																								
☐	Box No. VIII	Certain observations on the international application																								
Date of submission of the demand 23.03.2006	Date of completion of this report 20.10.2006																									
Name and mailing address of the international preliminary examining authority: European Patent Office D-80299 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tlx 523658 apmu d Fax +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Celler, Jakub Telephone No. +49 89 2399-																									

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2005/009968

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))
2. With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-88 as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

1-50 as originally filed

Claims, Numbers

1-46 as originally filed

Drawings, Sheets

1/10-10/10 as originally filed

- ☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing *(specify)*:
 - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing *(specify)*:
 - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2005/009968

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 35(IA)

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 35 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*).

☐ no international search report has been established for the said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b) and 13ter.2.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

24

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2005/009968

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation to restrict or pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ restricted the claims.
 - ☐ paid additional fees.
 - ☒ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee.
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid.
 - ☐ neither restricted the claims nor paid additional fees.
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is:
- ☐ complied with.
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos. .

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-14,19,24-31,40-48
	No: Claims	15-18,20-23,32-39
Inventive step (IS)	Yes: Claims	9
	No: Claims	1-8,10-48
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-34,36-48
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

24

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2005/009968

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, Item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report was established on the basis of:

a. type of material:

- ☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material:

- ☒ on paper
☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing:

- ☒ contained in the international application as filed
☒ filed together with the international application in electronic form
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
☐ received by this Authority as an amendment* on

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

- * If item 4 in Box No. 1 applies, the listing and/or table(s) related thereto, which form part of the basis of the report, may be marked "superseded."

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Claim 35 relates to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

For the assessment of the present claim 35 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Re Item IV

Lack of unity of invention

The present International patent application contains 1-46 claims.

Amongst that set of claims there are 8 independent claims, heading the groups of following subject matters.

1. Claims 1-14, 16-21 (partly), 25-39 (partly), which are all characterised by the common subject matter of claims 1, i.e. an antibody characterised in that it binds OX40L, contains a Fc part derived from human origin and does not bind complement factor C1q.
2. Claims 15, 16-21 (partly), 25-39 (partly), which are all characterised by the common subject matter of claims 15, i.e. an antibody characterised in that said antibody binds OX40L and comprises a variable region combination independently selected from the groups of sequences of variable regions provided in the list under points a-l, which relate

to SEQ ID NOS: 1-12,16-20

3. Claims 22,23,25-39(partly), which are all characterised by the common subject matter of claims 22, i.e. an antibody binding OX40L comprising a variable light chain and variable heavy chain, characterised in that the variable heavy chain comprises CDR3 selected from a list of SEQ ID NOS: 33-38 and/or the variable light chain comprises CDR3 selected from SEQ ID NOS: 51-57

4. Claims 24-25-35(partly),39(partly) which are all characterised by the common subject matter of claim 24, i.e. an antibody that is produced by a cell line selected from the group provided in the claim.

According to the description, page 24, lines 21-24, said cell lines produce antibodies which are useful as intermediates for the generation of antibodies characterised by not binding complement factor C1q and/or not binding to human Fc gamma receptor. In light of the description, as cited above, it is apparent that the antibodies as defined in the group of claims headed by claim 24 are not per se characterised by not binding complement factor C1q.

5. Claim 40 directed to a method of modifying the initial amino acid sequence of an parent antibody heavy chain CDR characterised by SEQ ID NOS: 21-38 and/or an parent antibody light chain CDR characterised by SEQ ID NOS: 39-57, by modifying encoding nucleic acid sequence so as to modify 1 amino acid in heavy chain CDR, 1-2 amino acids in heavy chain CDR2, 1-2 amino acids in heavy chain CDR3, 1-3 amino acids in light chain CDR1, 1-3 amino acids in light chain CDR2 and/or 1-3 amino acids in light chain CDR3, expressing said modified sequences in an antibody structure and measuring whether said antibody binds to OX40L with a given value of KD.

6. Claims 41,42, which are characterised by the common subject matter of claim 42, i.e. an antibody that binds OX40L, is of human IgG1 class and comprises gamma heavy chain SEQ ID NOS: 58,62 or 66.

7. Claims 43,44, which are characterised by the common subject matter of claim 43, i.e. an antibody that binds OX40L, is of human IgG1 class and contains mutation

78

L234A/L235A and comprises as gamma heavy chain SEQ ID NOS: 59,63 or 67

8. Claims 45,46, which are characterised by the common subject matter of claim 45, i.e. an antibody that binds OX40L, is of human IgG4 class and contains mutation S228P and comprises as gamma heavy chain SEQ ID NOS: 60,64 or 68.

It is noted that the groups of subject matters identified under points 2, 3, 5-8, above, which relate to SEQ ID NOS, do not have any SEQ ID NOS in common, hence said SEQ ID NOS do not represent any common technical features amongst said groups of subject matters.

Moreover, according to the present description, page 15, binding of antibody to C1q is caused by defined binding sites in the Fc part. Such binding sites are known in the state of the art (lines 2-5). Antibodies of sub-classes IgG1, IgG2 and IgG3 usually show C1q binding, whereas IgG4 do not bind C1q (lines 12-14). The expression "Fc part derived from human origin and does not bind complement C1q" denotes Fc part which is either a Fc part of human antibody of the subclass IgG4 or Fc part of other subclasses which is modified such as not to bind C1q (lines 15-19). Most preferred are Fc parts comprising heavy chain constant regions with mutations L234A and L235A (lines 24-27).

In light of the above information provided by the present description, the technical feature of claims 1, which characterises the group of subject matters defined under point 1, above: "contains a Fc part derived from human origin and does not bind complement factor C1q" represents a technical feature which is equivalent to the technical feature of the group of subject matters defined under point 8, above: "Is of human IgG4 class", and to the technical feature of the group of subject matters defined under point 7, above: "Is of human IgG1 class and contains mutation L234A/L235A". None of the remaining groups of subject matters defined under points 2-6, above, is characterised by any of the three technical features or any equivalent thereto.

In consequence, there is only one technical feature in common for all the claims: "an antibody characterised in that it binds OX40L".

6X

Document of the prior art Nohara et al, 2001, discloses anti-OX40L monoclonal antibody and the use of it to block the interaction of said ligand with the cognate receptor as a tool in amelioration of experimental autoimmune disease (Abstract).

In view of that disclosure of the prior art, the objective technical problem underlying the present application may be formulated as the provision of further anti-OX40L antibodies and further methods of generating said further antibodies. The present claims are directed to a number of such further antibodies and methods.

As discussed above, the only common technical features shared by all the claims is an anti-OX40L antibody. However, in view of the prior art above, said antibody does not represent a contribution over the prior art, because such an antibody is not new.

In consequence the subject matters of present claims were subdivided at the search state into independent groups by taking into account further technical features characterising said antibodies, which features fulfil the requirement of Rule 13.2 PCT, i.e. are common for all the subject matters of each subgroup and a priori represent the contribution made over the prior art.

Subject matters 1, 7 and 8, above, share the technical feature of claim 1: "contains a Fc part derived from human origin and does not bind complement factor C1q", because, that feature in subject 7 and 8 is reflected by equivalent technical features in the form of specific mutations, as discussed above. In consequence, the subject matters 1, 7 and 8 form a group of inventions having said technical feature in common.

Subject matters 2,3,5 and 6 are characterised by SEQ ID NOS, however, said SEQ ID NOS do not overlap amongst said subject matters, therefore each subject matter does not have any specific technical feature with the other subject matters in common. Hence there is lack of common "special technical feature" and said subject matters are non-unitary. Subject matter of point 4 also does not share any specific technical feature with the remainder of the subject matters and also represents a separate, non-unitary subject matter.

As the applicant paid the additional search fees, the International Search Report and the

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2005/009968

present written opinion relate to all 6 inventions as identified above, wherein the subject matters forming the group of inventions first mentioned in the claims, i.e. subject matters defined under points 1,7 and 8, above.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

The present International patent application relates to an antibody characterised in that it binds OX40L, contains a Fc part derived from human origin and does not bind complement factor C1q, an antibody characterised in that said antibody binds OX40L and comprises a variable region combination independently selected from the groups of sequences of variable regions provided in the list under points a-l. which relate to SEQ ID NOS: 1-12, 16-20, an antibody binding OX40L comprising a variable light chain and variable heavy chain, characterised in that the variable heavy chain comprises CDR3 selected from a list of SEQ ID NOS: 33-38 and/or the variable light chain comprises CDR3 selected from SEQ ID NOS: 51-57, an antibody that is produced by a cell line selected from the group provided in the claim 23, a method of modifying the initial amino acid sequence of a parent antibody heavy chain CDR characterised by SEQ ID NOS: 21-38 and/or a parent antibody light chain CDR characterised by SEQ ID NOS: 39-57, by modifying encoding nucleic acid sequence so as to modify 1 amino acid in heavy chain CDR, 1-2 amino acids in heavy chain CDR2, 1-2 amino acids in heavy chain CDR3, 1-3 amino acids in light chain CDR1, 1-3 amino acids in light chain CDR2 and/or 1-3 amino acids in light chain CDR3, expressing said modified sequences in an antibody structure and measuring whether said antibody binds to OX40L with a given value of KD, as well as, an antibody that binds OX40L, is of human IgG1 class and comprises gamma heavy chain SEQ ID NOS: 58, 62 or 66, an antibody that binds OX40L, is of human IgG1 class and contains mutation L234A/L235A and comprises gamma heavy chain SEQ ID NOS: 59, 63 or 67, and an antibody that binds OX40L, is of human IgG4 class and contains mutation S228P and comprises gamma heavy chain SEQ ID NOS: 60, 64 or 68.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2005/009968

The numerous subject matters of the claims do not form the unitary group of inventions in the sense of Rule 13 PCT (for details see point Re Item IV, above and the reasoning for the lack of unity attached to the ISR).

Invention I

Claims 1-14, 16-21 (partly), 25-39 (partly), 43-46.

In view of the fact that the invention first mentioned in the claims is characterised by the technical feature of claim 1: "contains a Fc part derived from human origin and does not bind complement factor C1q", or the equivalent technical features of claims 43 and 45, document of the prior art WO9958572 is taken into consideration.

Said document discloses a polypeptide molecule comprising a binding domain capable of binding a target molecule, and an effector domain having an amino acid sequence based on human immunoglobulin heavy chain, characterised in that the binding molecule is capable of binding the target molecule without triggering a significant complement dependent lysis, or cell mediated destruction of the target (page 7, lines 15-24). Moreover, on page 9, lines 10-13 it is stated that the inability to trigger significant complement lysis results from reduced affinity for C1q molecule.

The specific modifications in the human immunoglobulin heavy chain that result in said decrease in complement lysis are disclosed, inter alia, on page 10 and include a substitution of the amino acid at position 235 to alanine. Said substitution by alanine is at the same position as the substitution by alanine of present claim 43.

On pages 17-24 there are provided examples of diseases where the molecules of that disclosure, which bind target molecules but do not activate complement are to be used (see comment on page 24, lines 19-24).

Several mutant immunoglobulines based on IgG1, IgG2 or IgG4 are disclosed and demonstrated to have the desired properties (page 10, lines 29-31).

Specific examples of the molecules of that invention are provided as series of CAPATH-1 antibodies (page 44, ff.). The general consideration of why Fc-mediated properties, such as complement activation is inappropriate in clinical situations involving antibody treatment is provided on pages 4-7.

The difference between the contents of that disclosure and the subject matters of present

independent claims 1, 43 and 45, in the most general sense, is the fact that said disclosure of the prior art does not relate directly to OX40L binding molecule.

In consequence, the objective technical problem in the light of that disclosure may be formulated as provision of further molecules comprising a target binding domain and human immunoglobulin heavy chain derived domain, which is characterised in that it does not activate complement due to decreased binding of C1q, for clinical use and the methods of generating thereof.

The potential of the clinical use of anti-OX40 ligand monoclonal antibodies is known in the prior art, such as the disclosure by Nohara et al (2001). Also in the present description it is acknowledged on pages 1-2 that said anti-OX40L antibodies were documented in numerous disclosures to have potentially important clinical applications.

Therefor, in view of the disclosure of WO9958572 in combination with the fact that anti-OX40L monoclonal antibodies were envisaged in the prior art for a variety of clinical applications (e.g. Nohara et al.), the antibodies characterised by the technical features of claims 1-4,7,11-13,19 would be arrived at without inventive input, which renders said claims not inventive (Art. 33.3 PCT).

Moreover, disclosure of the prior art by Hezare et al, 2001, teaches that there are further mutations in the Fc region of antibodies which lead to abolishment of C1q binding and complement activation (Abstract). Said mutations are: K322A, L234A/L235A. Although the latter disclosure relates to anti-HIV-1 antibodies only, in view of the extensive teaching of WO9958572 in regard to the importance of obtaining antibodies with modified properties, the skilled person working in the field of providing antibodies for clinical use with abolished complement activation would be aware of said disclosure and would see the general applicability of said mutations for the provision of further antibodies for clinical use.

In view of the above information of the prior art the specified mutations of claims 7,8,10-13,43-44 do not represent a contribution over the prior art (Art. 33.3 PCT).

In regard to technical features of claims 5,6,14,16-21,28-39,43-46, which are represented, for example, by specific KD values, IC50 values or specific SEQ ID NOS of variable regions or constant regions, or other obvious technical feature or uses the following observation applies.

Said specific technical features of that claims could render the subject matter for which protection is sought inventive only if said features were demonstrated to result in unexpectedly increased suitability of the antibodies for specific clinical use or any other unexpected advantageous effect.

The disclosure of the present application does not provide any examples of unexpected suitability of said antibodies for clinical use. The examples 1-23 document the ability of the antibodies to bind OX40L and block the interaction of OX40L with the cognate receptor in a specific manner, which in turn influences T cell activation, as well as, the decreased ability to bind C1q and activate complement system. These examples represent a substantial amount of experimental work. However, this substantial amount of work does not appear to have represented undue burden, because, the skilled person was faced with a reasonable expectation of success at the outset, based on the information of the prior art, as discussed above.

The experimental work was only of routine nature and does not result in any unexpected effect. In consequence, the presence of inventive step of claims 5,6,14-18,20-23,43-46 cannot be acknowledged based on the information provided in the application (Art. 33.3 PCT).

Furthermore, document of the prior art WO9504568 discloses chimeric molecules composed of rodent originating antibody binding domain specific for a target, and a human immunoglobulin heavy chain heaving the sequence modified so as to have a particular effector function (page 11, lines 19-25). Wherein said particular effector function is to be present to a greater or lesser degree, which ever is more appropriate for a particular utility of said chimeric molecule (page 12, lines 10-13). One specific example is the introduction of specific mutations in gamma 1 heavy chain of the anti-CDw52 antibody (page 18, lines 22-25). Another example is molecule specific for OX40L (page 32-33, claims 1 and 10).

In view of the above two disclosures of the prior art WO9504568 and WO9958572, the concept of an antibody which binds OX40L and contains Fc part derived from human origine and does not bind complement factor C1q does not represent a contribution over the prior art. Also the equivalent technical feature of claim 43, i.e. substitution by alanine at position 235 also does not represent a contribution over the prior art.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2005/009968

In view of the above analysis it becomes apparent that claims 1 is not inventive (Art.33.3). Independent claim 43 also lacks the presence of inventive step. Therefore the common concept of claims 1, 43 and 45, which was a priori seen in the provision of anti-OX40L antibodies characterised by diminished complement activation, does not represent a contribution over the prior art. The technical features which underlie said common concept, i.e. "Fc part derived from human origin and does not bind complement factor C1q" or "being of IgG1 class containing mutation L234A/L235A" are not new or inventive, respectively. In consequence, the group of subject matters identified under points 1, 7 and 8, which was a priori regarded as unitary (see Re Item IV and the reasoning for the lack of unity objection provided with the ISR) does not represent a contribution over the prior art. In consequence, there is lack of "special technical feature" in the sense of Rule 13.2 PCT. The subject matters identified under points 1, 7 and 8, constitute a group of alternative solutions to the objective technical problem of the provision of further antibodies characterised by changed effector functions, as defined above.

As extensively discussed above, it is not apparent at present which of the numerous subject matters of the above points, if any, is associated with a special technical effect which would, in turn, render said subject matter inventive. In consequence, the comprehensive list of separate inventions is not provided with this communication.

It would be practicable to establish such a list of subject matters, only, if the inventive contribution of any elements of the application became reasonably established.

Also, detailed preliminary examination of further, a posteriori, non-unitary subject matters of the application exceeds the framework of this written opinion under PCT Chapter I. Such further preliminary examination may be obtained by the applicant, however, under the provisions of PCT Chapter II, if the applicant wishes that and pays additional preliminary examination fees.

Invention II

Claims 15,16-21(partly),25-39(partly).

Claim 15 is directed to an antibody characterised in that said antibody binds OX40L and that said antibody comprises a variable region combinations selected from the group listed under points a) to l), as amino acid sequences of given SEQ ID Nos.

It is noted here that none of the cited documents of the prior art discloses in an explicit manner the combinations of sequences provided under points a) to l) of claim 15. Nonetheless, Nohara et al, 2001, discloses anti-OX40L monoclonal antibodies. Totsuka et al, 2003, discloses also anti-OX40L antibodies. Also, Satake et al. 2000, discloses anti-OX40L antibodies.

It is a matter of basic knowledge to the skilled person that antibody specificity is determined by the amino acid sequence of the variable regions. As numerous examples of antibodies specific for OX40L are described in the prior art without disclosing explicitly the amino acid sequence of the variable region, the answer to the question whether, the antibodies of the prior art are characterised by the variable region sequences of claim 15 is not possible for the examiner to give in the absence of further information. In consequence, novelty of claim 15 cannot be acknowledged at present. It is the responsibility of the applicant to define the subject matter for which protection is sought in terms of technical features, in such a manner as to distinguish the subject matter of the claims from any subject matter of the prior art (Art. 33.2 in combination with Art. 6 PCT). In the present case the burden to demonstrate that the antibodies of claim 15 are new shifts to the applicant. As long as no positive evidence is provided to show that none of the anti-OX40L antibodies of the prior art falls under the scope of claim 15, novelty cannot be acknowledged. The remaining claims of this group of subject matters define further obvious embodiments, therefore no inventive contribution can be found amongst said claims (Art 33.3 PCT).

The attention of the applicant is drawn here to that a new disclosure of a sequence or a part of a sequence of an antibody does not render it new per se, even if said sequence of a known antibody was not disclosed previously.

It is further to be noted that in view of the fact that anti-OX40L antibodies are known in the prior art, the objective technical problem underlying the group of subject matters headed by independent claim 15 may be formulated as the provision of further anti-OX40L

antibodies. Said group of subject matters is directed to a large number of alternative solutions to the objective technical problem. Said solution do not have any structural or functional feature in common which would represent a contribution over the prior art, therefore there is lack of unity. Here it is noted that presence of amino acid sequences in variable regions of antibodies does not represent a contribution over the prior art per se. In order to constitute a unitarily link to the subject matters the amino acid sequences of said variable regions would have to have a common structural or functional element to them. Claim 15, however, does not define any such element. Also, the provision of further such antibodies would be accomplished by the skilled person without inventive input. For these antibodies to be regarded as inventive, there must be demonstrated an unexpected effect associated with them (Art. 33.3 PCT).

Invention III

Claims 22,23,25-39(partly),

Claim 22 is directed to anti-OX40L antibodies characterised by specific amino acid sequences of CDR3 of variable and/or light chain.

The documents of the prior art do not disclosed said CDR3 sequences of anti-OX40L antibodies in an explicit manner, however, as in case of Invention II, prior art cited above discloses anti-OX40L antibodies. As long as no evidence is provided that the anti-OX40L antibodies of the prior art are not characterised by CDR3 regions of claim 22, novelty of said claim cannot be acknowledged (Art. 33.2 PCT).

The objective technical problem here may be also formulated as the provision of further anti-OX40L antibodies. In consequence there is also the lack of unity a posteriori. The group of subject matters headed by claim 22 is directed to a number of alternative solutions, which are not linked by a common concept representing a contribution over the prior art, hence these are alternative independent solutions. Also, the provision of further such antibodies would be accomplished by the skilled person without inventive input. For these antibodies to be regarded as inventive, there must be demonstrated an unexpected effect associated with them (Art. 33.3 PCT).

Invention IV

Claims 24-25-35(partly),39(partly).

Claim 24 is directed to antibody characterised in that it is produced by cell line selected from a group. In the description it is clear that said antibodies are characterised by the ability to bind OX40L. As these cell lines were not disclosed in the prior art, the novelty of the antibodies is acknowledged (Art. 33.2 PCT). Nonetheless, also here, the objective technical problem is the provision of further anti-OX40L antibodies.

In view of the prior art cited above, each antibody of this group of antibodies also represents an alternative and separate solution of the objective technical problem, hence, there is a lack of unity. Also, the provision of further such antibodies would be accomplished by the skilled person without inventive input. For these antibodies to be regarded as inventive, there must be demonstrated an unexpected effect associated with them (Art. 33.3 PCT). The remaining claims of this group of subject matters define further obvious embodiments, therefore no inventive contribution can be found amongst said claims (Art 33.3 PCT).

Invention V

Claim 40, which is directed to a method of modifying the initial amino acid sequence of a parent antibody heavy chain CDR characterised by SEQ ID NOS: 21-38 and/or an parent antibody light chain CDR characterised by SEQ ID NOS: 39-57, by modifying encoding nucleic acid sequence so as to modify 1 amino acid in heavy chain CDR, 1-2 amino acids in heavy chain CDR2, 1-2 amino acids in heavy chain CDR3, 1-3 amino acids in light chain CDR1, 1-3 amino acids in light chain CDR2 and/or 1-3 amino acids in light chain CDR3, expressing said modified sequences in an antibody structure and measuring whether said antibody binds to OX40L with a given value of KD.

Modulation of binding specificity for antibodies by mutating CDR regions is known in the prior art, as exemplified by Gram et al, 1992. Claim 40 suggests merely the method. The application does not provide any specific examples for reducing the method to practice. In view of the fact that the present application does not document any examples of anti-OX40L antibodies the specificity of which would be improved via mutation of CDR regions, the concept of applying CDR mutations to improve binding specificity does not have any

inventive merit (Art. 33.3 PCT). The remaining claims of this group of subject matters define further obvious embodiments, therefore no inventive contribution can be found amongst said claims (Art 33.3 PCT).

Invention VI

Claims 41,42.

In view of the fact that the technical feature of the antibodies of claim 41, i.e. being of human IgG1 class and comprising specific sequences of ID Nos, have not been demonstrated in the application to solve any specific technical problem, the objective technical problem underlying the subject matter of claim 41 may be regarded, again, as the provision of further anti-OX40L antibodies. As discussed extensively in regard to Invention I, anti-OX40L antibodies are known, and were envisaged for clinical use in humans. Thus, the provision of humanised antibodies would be obvious. In consequence the subject matters of Invention VI lack the presence of inventive step (Art. 33.3 PCT). The remaining claims of this group of subject matters define further obvious embodiments, therefore no inventive contribution can be found amongst said claims (Art 33.3 PCT).

Anticuerpos Anti-OX40L

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5

Este invención se relaciona con anticuerpos anti-OX40L y, en particular, con anticuerpos anti-OX40L y variantes de los mismos que contienen una parte Fc derivada de origen humano y no se unen al factor C1q del complemento. Estos anticuerpos tienen nuevas e inventivas propiedades que causan un beneficio para

10

un paciente que sufre de enfermedades inflamatorias.

Anticuerpos Anti-OX40L

Esta invención se relaciona, de manera general, con anticuerpos anti-OX40L y, en particular, con anticuerpos anti-OX40L que no se unen al factor C1q del complemento, composiciones farmacéuticas y usos de las mismas. Preferiblemente, estos anticuerpos son humanos o anticuerpos humanizados.

El OX40L humano (gp34, SwissProt P23510) es expresado sobre células B activadas y células dendríticas con la ligación CD40/CD40L, y sobre células endoteliales en tejidos inflamatorios (Reseña: Weinberg, A.D., Trends Immunol. 23 (2002) 102-109). Este ha sido primero aislado a partir de células leucémicas humanas infectadas con HTLV-I (inmortalización de estas células T por medio de la generación de un ciclo autócrino con OX40). El OX40L y los anticuerpos contra este son mencionados, por ejemplo, en WO 95/12673; WO 95/21915; WO 99/15200; Baum, P.R., y otros, EMBO J. 13 (1994) 3992-4001; Imura, A., y otros, Blood 89 (1997) 2951-2958; Imura, A., y otros, J. Exp. Med. 183 (1996) 2185-2195; Kjaergaard, J., y otros, J. Immunol. 167 (2001) 6669-6677; Lane, P., J. Exp. Med. 191 (2000) 201-206; Mallett, S., y Barclay, A.N., Immunol. Today 12 (1991) 220-223; Mallett, S., y otros, EMBO J. 9 (1990) 1063-1068; Ndhlovu, L.C., y otros, J. Immunol. 167 (2001) 2991-2999; Ohshima, Y., y otros, J. Immunol. 159 (1997) 3838-3848; Rogers, P.R., y otros, Immunity 15 (2001) 445-455; Stüber, E., y Strober, W., J. Exp. Med. 183 (1996) 979-989; Stüber, E., y otros, Gastroenterology 115 (1998) 1205-1215; Takahashi, Y., y otros, J. Virol. 75 (2001) 6748-6757; Takasawa, N., y otros, Jpn. J. Cancer Res. 92 (2001) 377-382; Taylor, L., y Schwarz, H., J. Immunol. Meth. 255 (2001) 67-72; Weinberg, A.D., y otros, Nature Medicine 2 (1996) 183-189; Weinberg, A.D., y otros, Semin. Immunol. 10 (1998) 471-480; Weinberg, A.D., Trends Immunol. 23 (2002) 102-109; Wu, T., y otros, Transplant. Proc. 33 (2001) 217-218; Higgins, L.M., y otros, J. Immunol. 162 (1999) 486-493; y Yoshioka, T., y otros, Eur. J. Immunol. 30 (2000) 2815-2823. El OX40L humano es el ligando para la OX40 humana (CD134) la cual es expresada de manera transitoria en células CD4+ T. El acoplamiento de la OX40 por medio de su ligando conduce a una señal co-estimuladora para la activación de las células T. La interacción OX40/OX40L es descrita como que crea una señal bidireccional (Matsumura, Y., y otros, J. Immunol. 163 (1999) 3007-3011; Kotani, A., y otros, Immunol. Lett. 84 (2002) 1-7). Además, la interacción OX40/OX40L media la adhesión de las células T activadas a las células endoteliales en los

tejidos inflamatorios. Como el OX40L es solo expresado de manera transitoria en células B activadas, CD y células endoteliales, los anticuerpos para el OX40L deben bloquear de manera selectiva la activación de las células T y la adhesión a las células endoteliales durante una respuesta inflamatoria pero dejando las células T periféricas inactivas sin afectar. Yoshioka, A., y otros (Eur. J. Immunol. 30 (2000) 2815-2823) demostraron el potencial terapéutico de un anti-mOX40L mAb neutralizante en un modelo de ratón para artritis reumatoide. La administración de este mejoró dramáticamente la gravedad de la enfermedad. Este anticuerpo exhibió actividades similares en otros modelos de enfermedad relacionados, por ejemplo, la enfermedad inflamatoria de la piel, la enfermedad autoinmune experimental (EAE), GVHD, enfermedad urinaria inflamatoria del intestino (Yoshioka, A., y otros, Eur. J. Immunol 30 (1999) 2815- 2823; Salek-Ardakani, S., y otros, J. Exp. Med. 198 (2003) 315-324; Burgess, J.K., y otros, J. Allergy Clin. Immunol. 113 (2004) 683-689; Hoshino, A., y otros, Eur. J. Immunol. 33 (2003) 861-869; Arestides, R.S., y otros, Eur. J Immunol. 32 (2002) 2874-2880; Nohara, C, y otros, J. Immunol. 166 (2001) 2108-2115; Weinberg, A.D., y otros, J. Immunol. 162 (1999) 1818-1826; Higgins, L.M., y otros, J. Immunol. 162 (1999) 486-493; Humphreys, I.R., y otros, J. Exp. Med. 198 (2003) 1237-1242; Akiba, H., y otros, J. Exp. Med. 191 (2000) 375-380; Ishii, N., y otros, Eur. J. Immunol. 33 (2003) 2372-2381; Blazar, B.R., y otros, Blood 101 (2003) 3741-3748; Tsukada, N., y otros, Blood 95 (2000) 2434-2439; Akiba, H., y otros, Biochem. Biophys. Res. Commun. 251 (1998) 131-138.

Los anticuerpos en contra del OX40L han sido investigados por sus efectos anti-inflamatorios en diversos modelos de enfermedad (Sugamura, K., y otros, Nat. Rev. Immunol. 4 (2004) 420-431).

Tanaka, Y., y otros, Int. J. Cancer 36, (1985) 549-555; Tozawa, H., y otros, Int. J. Cancer 41 (1988) 231-238; y Miura, S., y otros, Mol. Cell. Biol. 11 (1991) 1313-1325 describen anticuerpos monoclonales en ratones llamados TARM-34 y TAG-34 que reaccionan con antígenos de superficie de líneas de linfocitos humanos que llevan un virus de leucemia de células T humanas del tipo I (HTLV-I). El anticuerpo TAG-34 se encuentra comercialmente disponible de MBL International Corporation. El TAG-34 se une también al OX40L.

Resumen de la Invención

91

La invención se relaciona con un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, caracterizado porque dicho anticuerpo se une al OX40L, contiene una parte Fc de origen humano y no se une al factor C1q del complemento humano y/o al receptor del Fcγ humano sobre células NK.

La invención se relaciona además con un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal caracterizado porque dicho anticuerpo contiene una parte Fc de origen humano, se une a OX40L y a OX40L desnaturalizado (en una inmunoelectrotransferencia (Western Blot)) en una concentración de anticuerpos de 100 ng. Este anticuerpo se une al mismo epítipo del polipéptido OX40L como el epítipo al cual se une el anticuerpo monoclonal LC.001. Tales anticuerpos son, por ejemplo, LC.001, LC.033 y LC.060. Estos anticuerpos son preferiblemente del tipo IgG1 humano (tipo natural) o no se unen al factor C1q del complemento humano y/o al receptor del Fcγ humano en células NK.

La invención se relaciona además con un anticuerpo que se une al OX40L caracterizado porque comprende una cadena variable ligera y una cadena variable pesada, caracterizado porque la cadena variable pesada comprende CDR1, CDR2 y CDR3 caracterizado porque CDR3 es seleccionada a partir de SEQ ID NOs: 33-38. Es especialmente preferido que CDR1 sea seleccionada a partir de SEQ ID NOs: 21-25, CDR2 sea seleccionada a partir de SEQ ID NOs: 28-32 y CDR3 sea seleccionada a partir de SEQ ID NOs: 33-38.

El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente caracterizado porque comprende una cadena variable ligera y una cadena variable pesada, caracterizado porque la cadena variable ligera comprende CDR1, CDR2 y CDR3 caracterizado porque CDR3 es seleccionada a partir de SEQ ID NOs: 51-57. Es especialmente preferido que CDR1 sea seleccionada a partir de SEQ ID NOs: 39-44, CDR2 sea seleccionada a partir de SEQ ID NOs: 45-50.y CDR3 sea seleccionada a partir de SEQ ID NOs: 51-57.

El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente caracterizado porque comprende una cadena variable pesada y una cadena variable ligera, caracterizado porque la cadena variable pesada comprende CDR1, CDR2 y CDR3 caracterizado porque CDR3 de la cadena pesada es seleccionada a partir de SEQ ID NOs: 33-38 y CDR3 de la cadena ligera es seleccionada a partir de SEQ ID

5 NOs: 51-57. Es especialmente preferido que la cadena variable pesada comprenda CDR1 seleccionada a partir de SEQ ID NOs: 21 -25, CDR2 seleccionada a partir de SEQ ID NOs: 26-32 y CDR3 seleccionada a partir de SEQ ID NOs: 33-38 y la cadena variable ligera comprenda CDR1 seleccionada a partir de SEQ ID NOs: 39-44, CDR2 seleccionada a partir de SEQ ID NOs: 45-50 y CDR3 seleccionada a partir de SEQ ID NOs: 51-57.

10 Todas las CDRs son seleccionadas, de manera independiente, de una a otra pero automáticamente de forma tal que el anticuerpo se una a OX40L. Por lo tanto, las CDRs de cadenas ligera y pesada del mismo anticuerpo LC pueden ser combinadas o las CDRs de cadena ligera de LC.001 con las CDRs de cadena pesada de LC.001, LC059 o LC.063. Las CDRs en cada cadena son separadas por medio de aminoácidos marco.

15 El anticuerpo, de acuerdo con la invención, es preferiblemente caracterizado porque el anticuerpo comprende CDRs seleccionadas, de manera independiente, a partir del grupo que consiste de

- 20 a) las CDRs de cadena variable ligera (V_L) de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 y las CDRs de cadena variable pesada (V_H) de SEQ ID NO:2;
- b) las CDRs de cadena variable ligera de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 y las CDRs de cadena variable pesada de SEQ ID NO:4;
- c) las CDRs de cadena variable ligera de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5 y las CDRs de cadena variable pesada de SEQ ID NO:6;
- 25 d) las CDRs de cadena variable ligera de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7 y las CDRs de cadena variable pesada de SEQ ID NO:8;
- e) las CDRs de cadena variable ligera de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9 y las CDRs de cadena variable pesada de SEQ ID NO: 10;
- f) las CDRs de cadena variable ligera de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:11 o 16 y las CDRs de cadena variable pesada de SEQ ID NO: 12;
- 30 g) el dominio de la cadena variable ligera (V_L) definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 y el dominio de la cadena variable pesada (V_H) definido por SEQ ID NO: 17;
- h) el dominio de la cadena variable ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:18 y el dominio de la cadena variable pesada definido por SEQ ID NO: 19;
- 35

- i) el dominio de la cadena variable ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 y el dominio de la cadena variable pesada definido por SEQ ID NO:20;

5 o un fragmento de los mismos que se une a OX40L.

El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente caracterizado porque dicho anticuerpo comprende una región variable seleccionada, de manera independiente, a partir del grupo que consiste de

10

- a) el dominio de la cadena variable ligera (V_L) definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 y el dominio de la cadena variable pesada (V_H) definido por SEQ ID NO:2;

15

- b) el dominio de la cadena variable ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 y el dominio de la cadena variable pesada definido por SEQ ID NO:4;

- c) el dominio de la cadena variable ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5 y el dominio de la cadena variable pesada definido por SEQ ID NO:6;

20

- d) el dominio de la cadena variable ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7 y el dominio de la cadena variable pesada definido por SEQ ID NO:8;

- e) el dominio de la cadena variable ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9 y el dominio de la cadena variable pesada definido por SEQ ID NO: 10;

25

- f) el dominio de la cadena variable ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11 o 16 y el dominio de la cadena variable pesada definido por SEQ ID NO: 12;

- g) el dominio de la cadena variable ligera (V_L) definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 y el dominio de la cadena variable pesada (V_H) definido por SEQ ID NO: 17;

30

- h) el dominio de la cadena variable ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18 y el dominio de la cadena variable pesada definido por SEQ ID NO: 19;

35

- i) el dominio de la cadena variable ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 y el dominio de la cadena variable pesada definido por SEQ ID NO:20;

o un fragmento de los mismos que se une a OX40L.

5 El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente caracterizado porque la región variable de la cadena ligera humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada, de manera independiente, a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 16 y 18.

10 El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente caracterizado porque la región variable de la cadena pesada humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada, de manera independiente, a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 17, 19 y 20.

15 Las regiones CDR de las cadenas pesada y ligera son mostradas en SEQ ID NO: 21-38 y 39-57.

20 El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente caracterizado porque el anticuerpo comprende el dominio de la cadena variable ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 y el dominio de la cadena variable pesada definido por SEQ ID NO:2, 17 o 20.

25 El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente caracterizado porque la región constante de la cadena pesada humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada, de manera independiente, a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO: 14 y 15 o la región constante de la cadena pesada SEQ ID NO:58.

30 El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente caracterizado porque el anticuerpo comprende una región constante de la cadena ligera- κ de SEQ ID NO: 13 o la región constante de cadena ligera de SEQ ID NO:61, 65 o 69.

35 Preferiblemente un anticuerpo de acuerdo con la invención es caracterizado por unirse al OX40L y por ser de la clase IgG1 humana (tipo natural) y comprende como cadena pesada y la SEQ ID NO: 58, 62 o 66. Especialmente preferido es un anticuerpo que comprende como

- a) cadena pesada y la SEQ ID NO:58 y como cadena ligera kappa la SEQ ID NO:61,

96

- b) cadena pesada y la SEQ ID NO:62 y como cadena ligera kappa la SEQ ID NO:65 o
- c) cadena pesada y la SEQ ID NO:66 y como cadena ligera kappa la SEQ ID NO:69.

5

Una realización adicional de la invención es un anticuerpo que se une al OX40L, caracterizado porque este es producido por medio de la línea celular hu-Mab<hOX40L>LC.001, hu-Mab<hOX40L>LC.005, hu-Mab<hOX40L>LC.010, hu-Mab<hOX40L>LC.019, hu-Mab<hOX40L>LC.029 o hu-Mab<hOX40L>LC.033.

10

El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente un anticuerpo quimérico, humano o humanizado.

15

El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente caracterizado porque se une al OX40L con un valor K_D de menos de 10^{-8} M (10^{-12} a 10^{-8} M), más preferiblemente por un rango K_D de 10^{-12} a 10^{-9} M en un ensayo BIAcore.

20

El anticuerpo de acuerdo con la invención preferiblemente inhibe la interacción del OX40L con OX40 en un ELISA empleando OX40L inmovilizado (preferiblemente OX40L biotinilado inmovilizado sobre una superficie de streptavidina) a una concentración de recubrimiento de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ con un valor IC_{50} de no más de 4 nM. Más preferido es el valor IC_{50} en el rango de 1 a 4 nM.

25

El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente caracterizado porque la ausencia de unión del anticuerpo al factor C1q del complemento se refiere a una medida de ensayo de ELISA en donde la unión máxima (B_{max}) del anticuerpo a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ al C1q es 30% o inferior, preferiblemente 20% o inferior comparada con el anticuerpo LC.001. Preferiblemente el anticuerpo no se une a $\text{Fc}\gamma\text{RI}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ y/o $\text{Fc}\gamma\text{RIIIA}$ humanos.

30

Especialmente preferido, el anticuerpo no se une al receptor del $\text{Fc}\gamma$ humano en las células efectoras NK.

35

El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente caracterizado porque la ausencia de unión del anticuerpo al receptor del $\text{Fc}\gamma$ en células NK se refiere al ensayo en donde la unión máxima (B_{max}) del anticuerpo a una

97

concentración de 20 µg/ml a células NK es 20% o inferior, preferiblemente 10% o inferior comparada a la Bmax del anticuerpo LC.001.

5 El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente caracterizado porque este no se une al FcγRI. Esto significa que el anticuerpo es caracterizado por un valor EC50 el cual es cinco veces o más, preferiblemente siete veces o más, tal como ocho veces o más comparada con el valor EC50 de LC.001, cuando es medido en un ensayo de prueba de unión del anticuerpo en una
10 concentración que oscila entre 0.078 - 10 µg/ml para una célula de linfoma de célula B que carece de FcγRIIA y FcγIIB, pero que expresa el FcγRI recombinante.

El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente caracterizado por ser un anticuerpo IgG4 o un anticuerpo IgG1 que comprende al menos una mutación de aminoácido, preferiblemente en la parte Fc humana, que causa la
15 ausencia de unión al factor C1q del complemento y/o la ausencia de unión al receptor del Fcγ humano en células NK.

El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente caracterizado porque este no activa el factor C3 del complemento.

20

El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente caracterizado por ser de la subclase IgG4 humano. En una realización adicional preferida de la invención, el anticuerpo es caracterizado por ser de cualquier clase IgG, preferiblemente siendo IgG1 o IgG4, que contiene al menos una mutación en
25 E233, L234, L235, G236, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 y/o P329 (numerado de acuerdo con el índice EU). Especialmente preferido son las mutaciones de IgG1 PVA236, L234A/L235A y/o GLPSS331 así como la mutación de IgG4 L235E. Es además preferido que el anticuerpo de la subclase IgG4 contenga la mutación S228P o la mutación S228P y L235E (Angal, S., y otros,
30 Mol. Immunol. 30 (1993) 105-108).

Por lo tanto, el anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente un anticuerpo de la subclase IgG1 humano, que contiene una o más mutaciones de PVA236, GLPSS331 y/o L234A/L235A (numerado de acuerdo con el índice EU).

35

Preferiblemente el anticuerpo de acuerdo con la invención es caracterizado porque se une al OX40L, siendo de la clase IgG1 que contiene la mutación L234A/L235A y comprende como la cadena pesada y SEQ ID NO: 59, 63 o 67.

- 5 Especialmente preferido es un anticuerpo que comprende como
- a) cadena pesada y SEQ ID NO:59 y como cadena ligera kappa la SEQ ID NO:61,
 - b) cadena pesada y SEQ ID NO:63 y como cadena ligera kappa la SEQ ID NO:65 o
 - 10 c) cadena pesada y SEQ ID NO:67 y como cadena ligera kappa la SEQ ID NO:69.

- 15 Preferiblemente el anticuerpo de acuerdo con la invención caracterizado por ser de la clase IgG4 que contiene la mutación S228P comprende como la cadena pesada y la SEQ ID NO: 60, 64 o 68.

- Especialmente preferido es un anticuerpo que comprende como
- a) cadena pesada y la SEQ ID NO:60 y como cadena ligera kappa la SEQ ID NO:61,
 - 20 b) cadena pesada y la SEQ ID NO:64 y como cadena ligera kappa la SEQ ID NO:65 o
 - c) cadena pesada y la SEQ ID NO:68 y como cadena ligera kappa la SEQ ID NO:69.

- 25 El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente caracterizado porque este no induce la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

- El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente caracterizado porque este no induce la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC).

30

- La invención por lo tanto, comprende anticuerpos anti-OX40L o cadenas sencillas pesadas o ligeras caracterizadas por sus CDRs, regiones variables, secuencias completas de aminoácidos o hibridomas y el cual comprende ninguna parte de Fc o cualquier tipo of parte Fc, preferiblemente IgG1 Fc humano o IgG4 Fc humano,
- 35 ya sea sin modificar de origen humano o modificado por medio de las anteriores mutaciones mencionadas.

101

La invención, por lo tanto, también comprende anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales, caracterizado porque dicho anticuerpos se unen a OX40L, contiene una parte Fc de origen humano y no se unen al factor C1q del complemento humano y/o al receptor del Fcγ humano en células NK, por ser de tipo IgG4 humano o de IgG1 humano o IgG4 humano ambos modificados por medio de las anteriores mutaciones mencionadas. La invención, por lo tanto, también comprende anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales, caracterizado porque dicho anticuerpos se unen a OX40L y a OX40L desnaturalizado (en una inmunoelectrotransferencia (Western Blot)) en una concentración de anticuerpos de 100 ng. Este anticuerpo se une al mismo epítopo del polipéptido OX40L como el epítopo al cual se une el anticuerpo monoclonal LC.001. Los anticuerpos comprenden ninguna parte de Fc o cualquier tipo de parte Fc, preferiblemente IgG1 humano o IgG4 humano, ya sea tipo natural o modificado por medio de las anteriores mutaciones mencionadas.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención tienen propiedades nuevas e inventivas que causan un beneficio un beneficio para un paciente con la necesidad de una terapia con anticuerpos en contra de OX40L, especialmente para un paciente que sufre de trastornos inflamatorios, especialmente de artritis reumatoide, asma alérgica, y GvHD en trasplante (ver también Sugamura, K., y otros, Nat. Rev. Immunol. 4 (2004) 420-431).

Una realización adicional de la invención es una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo, una cadena variable o un dominio CDR de los mismos de acuerdo con la invención.

En una realización preferida de la invención el anticuerpo es un Fab, F(ab')₂ o un fragmento de cadena sencilla.

Una realización adicional de la invención es un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

Una realización adicional de la invención es una célula anfitrión que comprende el vector de acuerdo con la invención.

Una realización adicional de la invención es un método para la preparación de un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende cultivar la célula anfitrión de acuerdo con la invención bajo condiciones que permiten la síntesis de dicha molécula de anticuerpo y recuperar dicha molécula de anticuerpo a partir de dicho cultivo.

Una realización adicional de la invención es una composición, preferiblemente una composición farmacéutica o una de diagnóstico del anticuerpo de acuerdo con la invención. Una realización adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Una realización adicional de la invención es un método para el tratamiento de un paciente con necesidad de terapia, caracterizado por administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

Una realización adicional de la invención es el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para terapia, preferiblemente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, especialmente para el tratamiento y/o prevención de artritis reumatoide, asma y GvHD (enfermedad de injerto contra anfitrión).

Una realización adicional de la invención es el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de trastornos inflamatorios, preferiblemente para el tratamiento of artritis reumatoide, asma y GvHD.

Una realización adicional de la invención es un kit de diagnóstico que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, un vector de acuerdo con la invención o una célula anfitrión de acuerdo con la invención.

Descripción Detallada de la Invención

El término "OX40L" se refiere a una proteína de membrana tipo II que pertenece a la familia de ligandos TNF. Los nombres adicionales son receptor ACT-4, CD134L, gp34 o TNF4_Humano. Esta tiene un peso molecular de 34 KDa y es almacenada en SwissProt con el número de acceso P23510.

101

El término "OX40" se otorga al receptor el cual se une a OX40L. Este es una proteína de membrana del tipo I que pertenece a la familia de receptores TNF. Los nombres adicionales son ACT- 4, receptor OX40L, antígeno CD134, antígeno
5 ACT35, TNR4_Humano. Este tiene un peso molecular de 50 kDa y es almacenado en SwissProt con el número de acceso P43489.

El término "anticuerpo" abarca las diversas formas de los anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales que incluyen pero no están limitados a
10 anticuerpos enteros, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos modificados mediante ingeniería genética (anticuerpos variantes o mutantes) siempre que las propiedades características de acuerdo con la invención se conserven. Especialmente preferidos son los anticuerpos monoclonales humanos o
15 humanizados, especialmente como anticuerpos humanos recombinantes.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpos monoclonales" tal como se emplean aquí se refieren a una preparación de la molécula de anticuerpos de una composición sencilla de aminoácidos.

20

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, esto es, la región de unión, proveniente de una fuente o especies y al menos una porción de una región constante derivada de una fuente diferente o especies, usualmente preparada por medio de técnicas
25 recombinantes de ADN. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una región murina variable y una región humana constante son preferidos. Otras formas preferidas de los "anticuerpos quiméricos" abarcados por la presente invención son aquellas en las cuales la región constante ha sido modificada o cambiada con respecto a aquella del anticuerpo original para generar las propiedades de
30 acuerdo con la invención, especialmente con respecto a la unión del C1q y/o la unión al receptor del Fc (FcR). Tales anticuerpos quiméricos también son referidos como "anticuerpos conmutados de clase." Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de
35 ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos que involucran las técnicas convencionales de ADN recombinante y de transfección de genes son bien conocidas en la técnica.

104

Ver, por ejemplo, Morrison, S.L., y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América 81 (1984) 6851-6855; Patentes de Estados Unidos Nos. 5,202,238 y 5,204,244.

5 El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los cuales la estructura o las "regiones que determinan la complementariedad" (CDR) han sido modificadas para comprender la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente cuando se compara con aquella de la inmunoglobulina precursora. En una realización preferida, una CDR murina es injertada dentro de la región marco
10 de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado." Ver, por ejemplo, Riechmann, L., y otros, Nature 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S., y otros, Nature 314 (1985) 268-270. Las CDRs particularmente preferidas corresponden a aquellas que representan secuencias que reconocen los antígenos anotados anteriormente para los anticuerpos quiméricos y
15 bifuncionales. Otras formas de "anticuerpos humanizados" abarcados por la presente invención son aquellas en las cuales la región constante ha sido adicionalmente modificada o cambiada con respecto a aquella del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente con respecto a la unión del C1q y/o a la unión al receptor del Fc (FcR).

20

El término "anticuerpo humano", tal como se emplea aquí, tiene la intención de incluir anticuerpos que tengan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, M.A., y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368- 374). Los anticuerpos
25 humanos también pueden ser producidos en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, con la inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. La transferencia del conjunto de genes de
30 inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos con el ataque de los antígenos (ver, por ejemplo, Jakobovits, A., y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América 90 (1993) 2551- 2555; Jakobovits, A., y otros, Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., y otros, Year Immunol. 7 (1993) 33-40). Los
35 anticuerpos humanos también pueden ser producidos en bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom, H.R., y Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381- 388; Marks, J.D., y otros, J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). Las técnicas de

103

Cole y otros y Boerner y otros también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y otros, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (Anticuerpos Monoclonales y Terapia de Cáncer), Alan R. Liss, p. 77 (1985); y Boerner, P., y otros, J. Immunol. 147 (1991) 88-95). Como ya se
5 mencionó para los anticuerpos quiméricos y humanizados, de acuerdo con la invención, el término "anticuerpo humano" tal como se emplea aquí también comprende tales anticuerpos que son modificados en la región constante para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente con respecto a la unión del C1q y/o la unión al FcR, por ejemplo, por medio de "conmutación de
10 clase", esto es, el cambio o la mutación de las partes Fc (por ejemplo, de IgG1 a IgG4 y/o mutación IgG1/IgG4). Además, la invención comprende anticuerpos monoclonales humanos en contra de OX40L los cuales se unen al C1q y/o al FcR. Tales anticuerpos humanos se caracterizan por una alta selectividad por el OX40L humano frente al OX40L de ratón (>30 veces menor la unión al OX40L de ratón
15 que al OX40L humano) y no exhiben unión no específica al TNF α o CD40L hasta una concentración de 500 nM. Tales anticuerpos son útiles para la generación de anticuerpos que no se unen al C1q y/o FcR.

El término "anticuerpo humano recombinante", tal como se emplea aquí, tiene la
20 intención de incluir todos los anticuerpos humanos que son preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tal como los anticuerpos aislados de una célula anfitrión tal como una célula NS0 o CHO o de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados empleando un vector de
25 expresión recombinante transfectado dentro de una célula anfitrión. Tales anticuerpos recombinantes humanos tienen regiones variables y constantes en una forma rearrreglada. Los anticuerpos recombinantes humanos de acuerdo con la invención han sido sometidos a una hipermutación somática in vivo. Así, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos
30 recombinantes son secuencias que, si bien son derivadas de y relacionadas con las secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de manera natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

La "región variable" (región variable de una cadena ligera (VL), región variable de
35 una cadena pesada (VH)) tal como se emplea aquí indica cada uno de los pares de cadena ligera y pesada que está involucrado directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios de las cadenas ligera y pesada variables

126

104

humanas tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias son ampliamente conservadas, conectadas por tres "hiperregiones variables" (o regiones que determinan la complementariedad, CDRs). Las regiones marco adoptan una conformación en hoja β y las CDRs pueden formar ciclos que conectan la estructura de hoja β . Las CDRs en cada cadena son mantenidas en sus estructuras tridimensionales por las regiones marco y forman junto con las CDRs de la otra cadena el sitio de unión del antígeno. Las regiones CDR3 de cadenas pesada y ligera de los anticuerpos juegan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos de acuerdo con la invención y por lo tanto, proporcionan un objeto adicional de la invención.

Los términos "hiperregión variable" o "porción de unión al antígeno de un anticuerpo" cuando se emplean aquí se refieren a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables por la unión al antígeno. La hiperregión variable comprende residuos de aminoácidos provenientes de las "regiones que determinan la complementariedad" o "CDRs". Las regiones "Marco" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable aparte de los residuos de las hiperregiones variables como se definen aquí. Por lo tanto, las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo comprenden del N- al C-terminal los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. Las CDRs en cada cadena son separadas por medio de tales aminoácidos marco. Especialmente, la CDR3 de la cadena pesada es la región que más contribuye a la unión al antígeno. Las regiones CDR y FR son determinadas de acuerdo con la definición estándar de Kabat y otros, Sequences of Proteins of Immunological Interest (Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico), 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

El término "ácido nucleico o molécula de ácido nucleico", tal como se emplea aquí, tiene la intención de incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser de hebra única o de hebra doble, pero preferiblemente es ADN de hebra doble.

El ácido nucleico es "operablemente conectado" cuando este es colocado dentro de una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretorio es operablemente enlazado al ADN para un polipéptido si este es expresado como una preproteína que participa en la

107

secreción del polipéptido; un promotor o intensificador es operablemente enlazado a una secuencia codificadora si este afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión de un ribosoma es operablemente enlazado a una secuencia codificadora si este es ubicado a fin de facilitar la traslación. Generalmente, "operablemente enlazado" significa que las secuencias de ADN que están enlazadas son contiguas, y, en el caso de un líder secretorio, contigua y en el marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no tienen que estar contiguos. El enlazamiento es realizado por medio de ligación en los sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, los adaptadores o enlazadores oligonucleótidos sintéticos son empleados de acuerdo con la práctica convencional.

Tal como se emplean aquí, las expresiones "célula," "línea celular," y "cultivo celular" son empleadas de manera intercambiable y todas esas denominaciones incluyen la progenie. Así, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y los cultivos derivados de ella sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. La progenie variante que tiene la misma función o actividad biológica como se eligió en la célula originalmente transformada está incluida. En donde la intención eran distintas denominaciones, ello será claro a partir del contexto.

Los "dominios constantes" no están involucrados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, y varias de estas puede ser además divididas en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4, IgA1 y IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas son llamadas α , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Los anticuerpos, de acuerdo con la invención, son preferiblemente del tipo IgG.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención contienen como parte Fc, preferiblemente una parte Fc derivada de origen humano y preferiblemente todas las otras partes de las regiones constantes humanas. La parte Fc de un anticuerpo está directamente involucrada en la activación del complemento, la

unión al C1q, activación del C3 y unión al receptor del Fc. Si bien la influencia de un anticuerpo sobre el sistema del complemento es dependiente de ciertas condiciones, la unión al C1q es causada por sitios de unión definidos en la parte Fc. Tales sitios de unión son conocidos en el estado de la técnica y descritos, por ejemplo, por Lukas, T.J., y otros, J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., y Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., y otros, Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., y otros, Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., y otros, J. Immunol. 164 (2000) 4178- 4184; Hezareh, M., y otros, J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., y otros, Immunology 86 (1995) 319-324; y EP 0 307 434. Tales sitios de unión son, por ejemplo, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numerado de acuerdo con el Índice EU de Kabat, véase más abajo). Los anticuerpos de la subclase IgG1, IgG2 e IgG3 usualmente muestran activación del complemento, unión al C1q y activación del C3, mientras que IgG4 no activan el sistema del complemento, no se unen al C1q y no activan C3. Tal como se emplea aquí, el término "parte Fc derivada de origen humano y no se une al factor C1q del complemento humano y/o al receptor de Fc γ humano en células NK" significa una parte Fc que es ya sea una parte Fc de un anticuerpo humano de la subclase IgG4 o una parte Fc de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2 o IgG3 el cual es modificado de tal forma que la unión al C1q, la activación del C3 y/o la unión al FcR, como se definen más abajo, no pueden ser detectadas. Una "parte Fc de un anticuerpo" es un término bien conocido por la persona versada en la materia y definido con base en la escisión con papaina de los anticuerpos. Preferiblemente la parte Fc es una parte Fc humana y especialmente preferido ya sea de la subclase IgG4 humana, preferiblemente mutada en la región de pivoteo (por ejemplo, S228P y/o L235E) o una parte Fc mutada de la subclase IgG1 humana. Las más preferidas son las partes Fc que comprenden regiones constantes de cadena pesada seleccionadas a partir de las regiones mostradas en SEQ ID NO: 14 y 15 o incluidas en SEQ ID NO: 58, 59, 60, SEQ ID NO: 14 con mutaciones L234A y L235A o SEQ ID NO: 15 con mutación S228P o mutaciones S228P y L235E.

La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une al OX40L y no se une al factor C1q del complemento, y/o al receptor del Fc. En una realización preferida de la invención, estos anticuerpos no inducen la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Preferiblemente, este anticuerpo está caracterizado porque este se une al OX40L, contiene una parte Fc derivada de origen humano y no se une al factor

107

C1q del complemento. Más preferiblemente, este anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano o humanizado. Las funciones efectoras mediadas por la parte Fc de la región Fc del anticuerpo se refieren a funciones efectoras que actúan después de la unión de un anticuerpo a un antígeno (estas funciones involucran la activación de la cascada y/o la activación celular por un receptor del Fc).

La función de la cascada del complemento puede ser evaluada por el ensayo CH50. Glóbulos rojos de oveja sensibilizados con anticuerpos anti-glóbulos rojos (EA) son adicionados al suero de ensayo para activar la ruta clásica resultando en hemólisis. El volumen de suero necesitado para lisis el 50% de los glóbulos rojos determina la unidad CH50. El AP-CH50 mide las rutas alternativa y la terminal. El procedimiento es similar solo que se emplean glóbulos rojos de conejo. La ruta alternativa es activada con la adición de suero de ensayo.

El C1q y dos proteasas de serina, C1r y C1s, forman el complejo C1, el primer componente de la ruta de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Para activar la cascada del complemento, el C1q se une a al menos dos moléculas de IgG1 o una molécula de IgM, sujeta al blanco antigénico (Ward, E.S., y Ghetie, V., *Ther. Immunol.* 2 (1995) 77-94). Burton, D.R., describió (*Mol. Immunol.* 22 (1985) 181-206) que la región de la cadena pesada que comprende los residuos de aminoácido 318 a 337 está siendo involucrada en la fijación del complemento. Duncan, A.R., y Winter, G. (*Nature* 332 (1988) 738-740), empleando la mutagénesis dirigida al sitio, informaron que Glu318, Lys320 y Lys322 forman el sitio de unión para el C1q. El papel de los residuos Glu318, Lys320 y Lys 322 en la unión del C1q fue confirmado por la capacidad de un péptido sintético corto que contiene estos residuos para inhibir la lisis mediada por el complemento.

El término "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" se refiere a la lisis del OX40L que expresa las células endoteliales humanas por el anticuerpo de acuerdo con la invención en la presencia del complemento. La CDC es medida preferiblemente por el tratamiento del OX40L que expresa las células endoteliales humanas con un anticuerpo de acuerdo con la invención en la presencia del complemento. Las células son preferiblemente etiquetadas con calceína. La CDC es hallada si el anticuerpo induce la lisis de 20% o más de las células blanco a una concentración de 30 µg/ml. Los inventores han encontrado que la unión

140

108

reducida al factor C1q del complemento en un ensayo ELISA es esencial para las propiedades de los anticuerpos de acuerdo con la invención. En tal ensayo en principio una placa de ELISA es recubierta con rangos de concentración del anticuerpo, al cual se adiciona C1q humano o suero humano purificados. La unión al C1q es detectada por medio de un anticuerpo dirigido contra el C1q seguido por un conjugado etiquetado con peroxidasa. La detección de la unión (unión máxima Bmax) es medida como densidad óptica a 405 nm (OD405) para el sustrato de peroxidasa ABTS® (2,2'-azino-di-[3-etilbenztiazolina-6-sulfonato (6)]. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un anticuerpo, caracterizado porque la ausencia de unión del anticuerpo al factor C1q del complemento se refiere a dicha medida del ensayo ELISA en donde la unión máxima (Bmax) del C1q a un anticuerpo, de acuerdo con la invención, a una concentración de 10 µg/ml del anticuerpo es 20% o inferior de la Bmax observada con el anticuerpo LC.001, preferiblemente 10% o inferior.

Es adicionalmente preferido, que un anticuerpo, de acuerdo con la invención, exhiba una activación reducida del factor C3 del complemento en un ensayo ELISA. El ensayo es llevado a cabo en la misma forma que el ensayo de C1q. En tal ensayo en principio una placa de ELISA es recubierta con rangos de concentración del anticuerpo, al cual se adiciona suero humano. La unión del C3 es detectada por medio de un anticuerpo dirigido contra C3 seguido por un conjugado etiquetado con peroxidasa. La detección de la unión (unión máxima Bmax) es medida como densidad óptica a 405 nm (OD405) para el sustrato de peroxidasa ABTS®. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un anticuerpo, caracterizado porque la ausencia de unión del anticuerpo al factor C3 del complemento se refiere a dicha medida del ensayo ELISA en donde la unión máxima (Bmax) de C3 al anticuerpo a una concentración de 10 µg/ml del anticuerpo es 10% de Bmax del anticuerpo LC.001 preferiblemente 5% o inferior.

El término "la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC)" es una función mediada por la unión al receptor del Fc y se refiere a la lisis del OX40L que expresa células blanco por medio de un anticuerpo, de acuerdo con la invención, en la presencia de células efectoras. La ADCC es medida preferiblemente por medio del tratamiento de una preparación de OX40L que expresa células eritroides (por ejemplo, células K562 que expresan el OX40L humano recombinante) con un anticuerpo, de acuerdo con la invención, en la presencia de células efectoras tales como las PBMC (células mononucleares

110

sanguíneas periféricas) recién aisladas o células efectoras purificadas provenientes de cubiertas amarillas, como monocitos o células NK (asesino natural). Las células blanco son etiquetadas con ^{51}Cr y posteriormente incubadas con los anticuerpos. Las células etiquetadas son incubadas con células efectoras y el sobrenadante es analizado por el ^{51}Cr liberado. Los controles incluyen la incubación de las células blanco endoteliales con las células efectoras pero sin el anticuerpo. La capacidad de los anticuerpos para inducir las etapas iniciales que median la ADCC fue investigada por medio de la medida de sus uniones a los receptores Fc γ que expresan células, tales como células, que expresan de manera recombinante Fc γ RI y/o Fc γ RIIA o células NK (que expresan esencialmente Fc γ RIIA). Preferiblemente, la unión al Fc γ R en células NK es medida. Las funciones efectoras de unión al receptor del Fc pueden ser mediadas por la interacción de la región Fc de un anticuerpo con receptores del Fc (FcRs), los cuales son receptores especializados de la superficie celular en células hematopoyéticas. Los receptores del Fc pertenecen a la superfamilia de la inmunoglobulina, y se ha demostrado que median tanto el retiro de los patógenos recubiertos con anticuerpos por medio de la fagocitosis de complejos inmunes, como la lisis de eritrocitos y otros blancos celulares diversos (por ejemplo, células tumorales) recubiertas con el anticuerpo correspondiente, vía la citotoxicidad mediada por la célula dependiente del anticuerpo (ADCC). Van de Winkel, J.G., y Anderson, CL, J. Leukoc. Biol. 49 (1991) 511-524). Los FcR son definidos por su especificidad por los isotipos de inmunoglobulina; los receptores del Fc para los anticuerpos IgG son referidos como Fc γ R, para IgE como Fc ϵ R, para IgA como Fc α R, etcétera. La unión al receptor del Fc es descrita, por ejemplo, en Ravetch, J.V., y Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492; Capel, P.J., y otros, Immunomethods 4 (1994) 25-34; de Haas, M., y otros, J. Lab. Clin. Med. 126 (1995) 330-341; y Gessner, J.E., y otros, Ann. Hematol. 76 (1998) 231-248.

El enlazamiento cruzado de receptores para el dominio Fc de anticuerpos IgG (Fc γ R) activa una amplia variedad de funciones efectoras que incluyen la fagocitosis, la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo, y la liberación de mediadores inflamatorios, al igual que la eliminación de complejos inmunes y la regulación de la producción de anticuerpos. En humanos, tres clases de Fc γ R han sido caracterizadas, las cuales son:

- 5 - El FcγRI (CD64) se une al IgG monomérico con elevada afinidad y es expresado en macrófagos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos. La modificación en IgG de al menos uno de E233-G236, P238, D265, N297, A327 y P329 reduce la unión al FcγRI. Los residuos de IgG2 en las posiciones 233-236, sustituidos en IgG1 e IgG4, redujeron la unión al FcγRI por 10³ veces y eliminaron la respuesta de monocitos humanos a los glóbulos rojos sanguíneos sensibilizados al anticuerpo (Armour, K.L., y otros. Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613-2624).
- 10 - El FcγRII (CD32) se une al IgG acomplejado con media a baja afinidad y es ampliamente expresado. Estos receptores pueden ser divididos en dos tipos importantes, FcγRIIA y FcγRIIB. El FcγRIIA es encontrado en muchas células involucradas en el asesinato (por ejemplo, macrófagos, monocitos, neutrófilos) y parece capaz de activar el proceso de asesinato. El FcγRIIB parece jugar un papel en los procesos inhibitorios y es encontrado en células B, macrófagos y en células cebadas y eosinófilos. En células B parece funcionar para suprimir la producción adicional de inmunoglobulina y el cambio de isotipo, por decir por ejemplo la clase IgE. En macrófagos, el FcγRIIB actúa para inhibir la fagocitosis cuando es mediada por el FcγRIIA. En eosinófilos y células cebadas la forma b puede ayudar a suprimir la activación de estas células a través de la IgE que se une a su receptor separado. La unión reducida para el FcγRIIA es encontrada, por ejemplo, para la mutación IgG de al menos uno de E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 y K414.
- 15 - El FcγRIII (CD 16) se une al IgG con media a baja afinidad y existe como dos tipos. El FcγRIIIA es encontrado en células NK, macrófagos, eosinófilos y algunos monocitos y células T y media la ADCC. El FcγRIIIB es altamente expresado en neutrófilos. La unión reducida al FcγRIIIA es encontrada, por ejemplo, para la mutación de al menos uno de E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 y D376.
- 20 - El mapeo de los sitios de unión en el IgG1 humano para los receptores del Fc, los sitios de mutación anteriormente mencionados y los métodos para medir la unión
- 25 - El mapeo de los sitios de unión en el IgG1 humano para los receptores del Fc, los sitios de mutación anteriormente mencionados y los métodos para medir la unión
- 30 - El mapeo de los sitios de unión en el IgG1 humano para los receptores del Fc, los sitios de mutación anteriormente mencionados y los métodos para medir la unión
- 35 - El mapeo de los sitios de unión en el IgG1 humano para los receptores del Fc, los sitios de mutación anteriormente mencionados y los métodos para medir la unión

111

al Fc γ RI y al Fc γ RIIA son descritos en Shields, R.L., y otros JBC 276 (2001) 6591-6604.

- El término "receptor del Fc" cuando se emplea aquí, se refiere a los receptores de activación caracterizados por la presencia de una secuencia ITAM citoplasmática asociada con el receptor (ver, por ejemplo, Ravetch, J.V., y Bolland, S., Annu. Rev. Immunol. 19 (2001) 275-290). Tales receptores son Fc γ RI, Fc γ RIIA y Fc γ RIIIA. Los anticuerpos, de acuerdo con la invención, preferiblemente exhiben una unión reducida a los receptores Fc γ , preferiblemente al Fc γ RIIIA.
- 10 Preferiblemente el término "ausencia de unión al Fc γ R" significa que en una concentración de anticuerpos de 10 μ g/ml la unión de un anticuerpo, de acuerdo con la invención, a las células NK es 10% o menos de la unión encontrada para el anticuerpo LC.001.
- 15 Si bien el IgG4 exhibe unión reducida al FcR, los anticuerpos de otras subclases de IgG exhiben unión fuerte. Sin embargo, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida de carbohidrato de Fc), Pro329 y 234, 235, 236 y 237 Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434, e His435 son residuos que, proporcionan si están alterados, también reducen la unión al FcR (Shields, R.L., y otros J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., y otros FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., y otros, Immunology 86 (1995) 319-324; y EP 0 307 434). Preferiblemente un anticuerpo, de acuerdo con la invención, de la subclase IgG1 o IgG2 comprende la mutación PVA236, GLPSS331 y/o L234A/L235A. Un anticuerpo, de acuerdo con la invención, de la subclase IgG4 comprende
- 25 preferiblemente la mutación L235E. Las mutaciones adicionalmente preferidas de IgG4 son S228P o L235E y S228P (comparar tabla 1).

- El término "unión al OX40L", tal como se emplea aquí, significa que la unión del anticuerpo al OX40L humano en un ensayo BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia).
- 30 Para confirmación adicional, la unión al OX40L también puede ser determinada en un ELISA en el cual el OX40L purificado es recubierto para placas de microtitulo, o en un ensayo FACS en el cual el anticuerpo directa o indirectamente etiquetado es enlazado a células K562 que expresan el OX40L.

- 35 En el ensayo BIAcore el anticuerpo es enlazado a una superficie y la unión del OX40L es medida por medio de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR). La

111

- afinidad de la unión es definida por los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo al antígeno), k_d (constante de velocidad para la disociación), y K_D (k_d/k_a). Los anticuerpos, de acuerdo con la invención, exhiben una K_D de 10^{-8} o menos, preferiblemente de alrededor de 10^{-12} a 10^{-9} M (ver ejemplos). Por consiguiente, la presente invención se refiere a un anticuerpo, como se describió anteriormente, en donde el anticuerpo se une al OX40L con un valor K_D de menos de 10^{-8} M en un ensayo BIAcore, preferiblemente en donde el rango K_D es 10^{-12} a 10^{-9} M.
- 10 En el ELISA de unión específica al OX40L, el OX40L es recubierto sobre placas de microtítulo y la unión del anticuerpo al OX40L es detectada con un anti- IgG humano conjugado con HRP y las etapas usuales de un ELISA. Los valores EC_{50} en este ensayo están preferiblemente en el rango entre 3 nM y 8 nM.
- 15 El término "que inhibe la unión de OX40 al OX40L", tal como se emplea aquí, se refiere a la unión del anticuerpo, descrito en la presente invención, al OX40L humano, inhibiendo de ese modo la interacción OX40 / OX40L, e inhibiendo de ese modo la transducción de la señal inducida por el OX40L.
- 20 Los anticuerpos de la presente invención inhiben la interacción hOX40L/OX40 preferiblemente
- i) en el nivel in vitro mostrado por un ensayo ELISA al bloquear la interacción del OX40L inmovilizado, biotinilado con el OX40 soluble por el anticuerpo a una concentración de recubrimiento (fase sólida) de 0.5 μ g/ml de OX40L biotinilado con un valor IC_{50} en el rango de 1 nM - 4 nM,
 - 25 ii) en el nivel in vitro mostrado por un ensayo Biacore al bloquear la interacción de OX40 inmovilizado con OX40L soluble (10 nM, preferiblemente como hOX40L-His) por el anticuerpo a una concentración de anticuerpos de 0.78 - 100 nM con un valor IC_{50} en el rango de 1 nM - 10 nM,
 - 30 iii) en el nivel celular mostrado por un ensayo FACS en el cual el anticuerpo bloquea la interacción de las células K562 que expresan el OX40L (K562_OX40L) en una concentración de 2×10^5 células/muestra con OX40 con un valor IC_{50} en el rango de 4 - 20 nM,
 - 35

- iv) por un ensayo de transducción de señal de OX40 en el cual el anticuerpo bloquea la transducción de la señal de OX40 inducido por el K562JDX40L, dentro de 3×10^4 células HeLa que expresan OX40 por muestra, lo cual resulta en un bloqueo de la activación NF κ B con un valor IC50 en el rango de 1 - 5 nM,
- 5
- v) por un ensayo de activación de células T, en el cual el anticuerpo bloquea la activación de células T inducidas por el OX40L por medio de K562_OX40L a una concentración de 1.5×10^5 células/muestra y a una concentración PHA de 0.75 μ g/ml con un valor IC50 en el rango de 1 nM a 10 nM, y/o
- 10
- vi) por un ensayo de activación de células T, en el cual el anticuerpo bloquea la activación de células T inducidas por el OX40L por medio de células B activadas o células dendríticas (ensayo de Tétanos) a una concentración de anticuerpos de 10 μ g/ml, una inhibición de 40% - 60% se obtuvo.
- 15

Se prefieren los anticuerpos que mostraron en un ensayo ELISA inhibición al bloquear la interacción del OX40L inmovilizado con OX40 soluble a una concentración de recubrimiento de 0.5 μ g/ml de OX40L con un valor IC50 en el

20

rango de 1 nM - 4 nM.

Por consiguiente, una realización más preferida de la presente invención se refiere a un anticuerpo, caracterizada porque dicho anticuerpo, de ese modo inhibe la interacción OX40 / OX40L, y de ese modo inhibe la transducción de la señal

25

inducida por el OX40L.

Es adicionalmente preferido, que un anticuerpo, de acuerdo con la invención, no exhiba unión no específica al TNF α y al CD40L hasta una concentración de 500 nM de TNF α o CD40L.

30

Es adicionalmente preferido, que un anticuerpo, de acuerdo con la invención, exhiba al menos 30 veces menos unión al OX40L de ratón comparada con el OX40L humano. Es adicionalmente preferido, que un anticuerpo, de acuerdo con la invención, en una concentración de 10 μ g/ml no induzca regulación

35

descendente de la expresión de OX40L en células HUVEC.

En una realización adicional preferida, los anticuerpos de la presente invención son caracterizados porque ellos comprenden una combinación de dominio variable seleccionada, de manera independiente, a partir del grupo que consiste de las combinaciones

5

- a) el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo LC.001 definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 y el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo LC.001 definido por SEQ ID NO:2;
- b) el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo LC.005 definido por la
10 secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 y el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo LC.005 definido por SEQ ID NO:4;
- c) el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo LC.010 definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5 y el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo LC.010 definido por SEQ ID NO:6;
- 15 d) el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo LC.029 definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7 y el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo LC.029 definido por SEQ ID NO:8;
- e) el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo LC.019 definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9 y el dominio variable de cadena
20 pesada del anticuerpo LC.019 definido por SEQ ID NO:10;
- f) el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo LC.033 definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:11 O '16 y el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo LC.033 definido por SEQ ID NO: 12
- g) el dominio variable de cadena ligera (V_L) definido por la secuencia de
25 aminoácidos SEQ ID NO:1 y el dominio variable de cadena pesada (V_H) definido por SEQ ID NO:17;
- h) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:18 y el dominio variable de cadena pesada definido por SEQ ID NO:19;
- 30 i) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 y el dominio variable de cadena pesada definido por SEQ ID NO:20.

En una realización adicional preferida, los anticuerpos de la presente invención
35 son caracterizados porque ellos comprenden una región constante seleccionada, de manera independiente, a partir del grupo que consiste de

114

115

- k) la cadena ligera / kappa definida por la secuencia SEQ ID NO:13;
- l) la cadena pesada / gamma del isotipo IgG1 SEQ ID NO: 14 con una o más mutaciones seleccionadas a partir de L234A y L235A, PVA236 o GLPSS331;
- 5 m) la cadena pesada / gamma del isotipo IgG4 SEQ ID NO: 15;
- n) la cadena pesada / gamma cadena del isotipo IgG4 SEQ ID NO: 15 con la mutación S228P o las mutaciones S228P y L235E.
- o) la cadena ligera constante incluida en SEQ ID NO:61, 65 o 69
- p) la cadena pesada constante incluida en SEQ ID NO:58, 59, 60, 62, 63, 64,
- 10 66, 67 o 68.

Además son preferidas todas las combinaciones de cada combinación de dominios variables del anticuerpo a) - i) junto con una cadena gamma l), m), n) o p) y preferiblemente con una cadena kappa k) u o). Especialmente preferidos son

15 los anticuerpos que comprenden las cadenas variables del anticuerpo LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033, LC.059, LC.060 o LC.063 cada una con la cadena kappa definida por la secuencia SEQ ID NO:13 o la cadena ligera constante incluida en SEQ ID NO:61, 65 o 69 y la cadena pesada / gamma del isotipo IgG1 SEQ ID NO:14 con las mutaciones L234A y L235A o la cadena

20 pesada constante incluida en SEQ ID NO:59, 63 o 67; anticuerpos que comprenden las cadenas variables del anticuerpo LC.001, LC.005, LC.010; LC.019, LC.029, LC.033, LC.059, LC.060 o LC.063 cada uno con la cadena kappa definida por la secuencia SEQ ID NO:13 o la cadena pesada constante incluida en SEQ ID NO:59, 63 o 67 y la cadena pesada / gamma del isotipo IgG4 SEQ ID

25 NO:15 o la cadena pesada constante incluida en SEQ ID NO:60, 64 o 68, todas tres sin la mutación S228P; anticuerpos que comprenden las cadenas variables del anticuerpo LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033, LC.059, LC.060 o LC.063 cada uno con la cadena kappa definida por la secuencia SEQ ID NO: 13 o la cadena ligera constante incluida en SEQ ID NO:61, 65 o 69 y la cadena

30 pesada / gamma del isotipo IgG4 SEQ ID NO: 15 con la mutación S228P o la cadena pesada constante incluida en SEQ ID NO:60, 64 o 68.

Preferiblemente, los anticuerpos comprenden la CDR de la cadena variable ligera de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 y la CDR de la cadena variable

35 pesada de SEQ ID NO:2, 17 o 20 o la CDR de la cadena variable ligera de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18 y la CDR de la cadena variable pesada de SEQ ID NO: 19.

113

- Los anticuerpos preferidos son caracterizados porque los anticuerpos son de la subclase IgG4 humana o de otra subclase humana (preferiblemente IgG1) que comprende al menos una mutación de aminoácido que causa la ausencia de unión al factor C1q del complemento y/o la pérdida de la unión al FCR. Tales anticuerpos variantes preferidos comprenden, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14 con las mutaciones L234A y L235A o SEQ ID NO: 15 con o sin la mutación S228P.
- 5
- 10 Los anticuerpos preferidos, de acuerdo con la invención, son anticuerpos definidos como IgG1v1 (PVA-236; GLPSS331 como se especificó por E233P; L234V; L235A; delta G236; A327G; A330S; P331S), IgG1v2 (L234A; L235A) y IgG4v1 (S228P; L235E) y IgG4x (S228P).
- 15 La línea celular del hibridoma hu-Mab<hOX40L>LC.001, de acuerdo con la invención, fue depositada, bajo el Tratado de Budapest para el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes, con Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemania, el 27 de julio de 2004 bajo el Depósito No.
- 20 DSM ACC 2672.
- Las líneas celulares del hibridoma hu-Mab<hOX40L>LC.005 (DSM ACC 2685), hu-Mab<hOX40L>LC.010 (DSM ACC 2686), hu-Mab<hOX40L>LC.019, hu-Mab<hOX40L>LC.029 (DSM ACC 2688) y hu-Mab<hOX40L>LC.033 (DSM ACC
- 25 2689), de acuerdo con la invención, fueron depositadas, bajo el Tratado de Budapest para el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes, con Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemania, el 2 de septiembre de 2004.
- 30 Los anticuerpos disponibles a partir de dichas líneas celulares son realizaciones preferidas de la invención y son especialmente útiles como sustancias intermediarias para la generación de anticuerpos, de acuerdo con la invención, que no se unen al factor C1q del complemento y/o no se unen al receptor del Fcγ humano.
- 35

119

Las realizaciones más preferidas de la invención son anticuerpos anti-OX40L aislados que se unen al OX40L y se unen al mismo epítipo de OX40L al cual también se unen los anticuerpos monoclonales LC.005, LC.010 o LC.029 producidos por las líneas celulares del hibridoma depositadas.

5

Una realización adicional de la invención es un método para la producción de un anticuerpo en contra de OX40L el cual no se une al factor C1q del complemento humano y/o al receptor del Fc γ humano, caracterizado porque la secuencia de un ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo que se une al OX40L con un valor KD de menos de 10^{-8} M es modificado de tal forma que dicho anticuerpo modificado no se une al factor C1q del complemento y/o al receptor del Fc γ humano en células NK, dicho ácido nucleico modificado y el ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo son insertados dentro de un vector de expresión, dicho vector es insertado en una célula hésped procariontica o eucariótica, la proteína codificada es expresada y recuperada a partir de la célula anfitrión o el sobrenadante.

Una realización adicional de la invención es un método para la producción de un anticuerpo, de acuerdo con la invención, que no se une al factor C1q del complemento y/o que no se une al receptor del Fc γ humano caracterizado porque un anticuerpo disponible a partir de una de dichas líneas celulares es modificado por medio de "cambio de clase", esto es cambio o mutación de la parte Fc (por ejemplo, a partir de la mutación de IgG1 a IgG4 y/o IgG1/IgG4) preferiblemente definido como IgG1v1 (PVA-236; GLPSS331 como es especificado por E233P; L234V; L235A; delta G236; A327G; A330S; P331S), IgG1v2 (L234A; L235A) y IgG4v1 (S228P; L235E) e IgG4x (S228P).

En una realización adicional preferida, estos anticuerpos también comprenden fragmentos de anticuerpos seleccionados a partir del grupo que consiste de Fab, F(ab')₂ y fragmentos de cadena sencilla.

Una anticuerpo anti-OX40L "variante", se refiere aquí, por lo tanto, a una molécula que se diferencia en la secuencia de aminoácidos a partir de una secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-OX40L "precursor" en virtud de la adición, eliminación y/o sustitución de uno o más residuo(s) de aminoácidos en la secuencia del anticuerpo precursor. En la realización preferida, la variante comprende una o más substitución(es) de aminoácidos en una o más región(es)

- 5 constante(s) o variable(s) del anticuerpo precursor, preferiblemente en la región constante. Por ejemplo, la variante puede comprender al menos uno, por ejemplo, de alrededor de uno a alrededor de diez, y preferiblemente de alrededor de dos a alrededor de cinco, sustituciones en una o más regiones variables del anticuerpo precursor. Normalmente, la variante tendrá una secuencia de aminoácidos que tengan al menos 90% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de dominio constante y/o variable del anticuerpo precursor, más preferiblemente al menos 95%, y lo más preferiblemente al menos 99%.
- 10 La invención comprende un método de modificar la secuencia inicial de aminoácidos de un CDR de cadena pesada de un anticuerpo precursor seleccionado a partir del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 21-38 y/o un CDR de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado a partir del grupo que consiste de
- 15 dicha secuencia inicial de aminoácidos, modificar dicho ácido nucleico en el que un aminoácido es modificado en la CDR1 de cadena pesada, 1-2 aminoácidos son modificados en la CDR2 de cadena pesada, 1-2 aminoácidos son modificados en la CDR3 de cadena pesada, 1-3 aminoácidos son modificados en la CDR1 de cadena ligera, 1-3 aminoácidos son modificados en la CDR2 de cadena ligera, y/o
- 20 1-3 aminoácidos son modificados en la CDR3 de cadena ligera, expresar dicha secuencia modificada de aminoácidos de la CDR en una estructura de anticuerpo, medir si dicho anticuerpo se une al OX40L con un K_D de menos de 10^{-8} M y seleccionar dicha CDR modificada si el anticuerpo se une al OX40L con un K_D de menos de 10^{-8} M. Preferiblemente tales modificaciones son modificaciones
- 25 conservativas de secuencia.

- 30 La identidad u homología con respecto a la secuencia es definida aquí como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos con los residuos del anticuerpo precursor, después de alinear las secuencias e introducir vacíos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Ninguno de N-terminal, C-terminal, o extensiones, eliminaciones, o inserciones internas dentro de la secuencia del anticuerpo será interpretada como que afecta la identidad u homología de la secuencia. La variante retiene la capacidad de unirse al OX40L humano y preferiblemente tiene
- 35 propiedades, las cuales son superiores a aquellas del anticuerpo precursor. Por ejemplo, la variante puede tener efectos colaterales reducidos durante el tratamiento de la artritis reumatoide y el asma dado que el OX40L no solo es

7/1

expresado transitoriamente en células B, células dendríticas y macrófagos, sino que además lo es en células endoteliales (Kotani, A., y otros, Immunol. Lett. 84 (2002) 1-7), células del músculo liso de las vías aéreas (= ASM) (Burgess, J.K., J. Allergy Clin. Immunol 113 (2004) 683-689) y células microgliales (Weinberg, A.D., y otros, J. Immunol. 162 (1999) 1818-1826). La unión de los anticuerpos en contra del OX40L a células endoteliales, células ASM y microgliales puede resultar en daño celular y de células endoteliales resultando en fuga vascular, de células ASM resultando en destrucción del pulmón, de células microgliales resultando en daños de la microglia.

10

El anticuerpo "precursor" aquí es uno, el cual es codificado por una secuencia de aminoácidos empleada para la preparación de la variante. Preferiblemente, el anticuerpo precursor tiene una región marco humana y, si está presente, tiene (una) región(es) constante(s) del anticuerpo humano. Por ejemplo, el anticuerpo precursor puede ser un anticuerpo humano o humanizado, preferiblemente del tipo IgG1.

Los anticuerpos, de acuerdo con la invención, incluyen, además, tales anticuerpos que tengan "modificaciones conservativas de la secuencia", las modificaciones del nucleótido y de la secuencia de aminoácidos, que no afectan o alteran las características anteriormente mencionadas del anticuerpo, de acuerdo con la invención. Las modificaciones pueden ser introducidas por medio de técnicas estándar conocidas en la técnica, tal como la mutagénesis dirigida al sitio y la mutagénesis mediada por la PCR. Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen unas en las cuales el residuo de aminoácido es reemplazado con un residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral similar. Las familias de los residuos de aminoácido que tengan cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, un residuo de aminoácido pronosticado como no esencial en un anticuerpo anti-OX40L

humano puede ser preferiblemente reemplazado con otro residuo de aminoácido a partir de la familia de la misma cadena lateral.

5 Las sustituciones de aminoácidos pueden ser llevadas a cabo por medio de mutagénesis basada en modelamiento molecular como es descrito por Riechmann, L., y otros, Nature 332 (1988) 323-327 y Queen, C, y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América 86 (1989) 10029-10033.

10 La invención comprende además un método para la producción de un anticuerpo, caracterizado porque la secuencia de un primer ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo que se une al OX40L con un valor KD de menos de 10^{-8} M es modificado de tal forma que dicho anticuerpo modificado no se une al factor C1q del complemento y/o al receptor del Fc γ humano en células NK, dicho primer ácido nucleico modificado y un segundo ácido nucleico que codifica la
15 cadena ligera de dicho anticuerpo son insertados dentro de un vector de expresión, dicho vector es insertado en una célula huésped procariótica o eucariótica, cultivar dicha célula anfitrión bajo condiciones que permitan la síntesis de dicho anticuerpo y recuperar dicho anticuerpo a partir de dicho cultivo.

20 La invención comprende además un método para la producción de un anticuerpo, de acuerdo con la invención, y que comprende una parte Fc derivada de origen humano, dicho método comprende las etapas de a) transformar una célula anfitrión con una primer secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo precursor humano, de acuerdo con la invención, y una
25 segunda secuencia de ADN que codifica una cadena pesada de dicho anticuerpo precursor humano en donde la parte Fc es modificada para que dicha parte Fc no se una al factor C1q del complemento y/ o al receptor del Fc; b) expresar dichas primer y segunda secuencias de ADN secuencia a fin de que dichas cadenas pesada y ligera del anticuerpo sean producidas y c) recuperar dicho anticuerpo a
30 partir de la célula anfitrión o del cultivo de células anfitrión.

La presente invención también comprende moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo mencionado anteriormente, los vectores correspondientes comprendiendo estos ácidos nucleicos y la célula anfitrión correspondiente para
35 estos vectores. La invención abarca un método para la preparación de los anticuerpos que comprende cultivar las células anfitrión correspondientes bajo condiciones que permiten la síntesis de dichas moléculas de anticuerpos y

121

recuperar dichos anticuerpos a partir de dicho cultivo, por ejemplo, al expresar un ácido nucleico que codifica una cadena pesada y un ácido nucleico que codifica una cadena ligera en célula anfitrión procariótica o eucariótica y recuperar dicho polipéptido a partir de dicha célula.

5

Los usos diagnósticos y terapéuticos para el anticuerpo son contemplados. En una aplicación diagnóstica, la invención proporciona un método para determinar la presencia de la proteína de OX40L que comprende exponer una muestra sospechosa de contener OX40L al anticuerpo anti-OX40L y determinar la unión
10 del anticuerpo a la muestra. La proteína de OX40L puede ser insertada dentro de la membrana celular de las células que expresan OX40L por medio de su dominio transmembrana o puede ocurrir como dominio extracelular soluble en fluidos corporales liberada por medio de mecanismos como la mudanza o la liberación proteolítica. Para este uso, la invención proporciona un kit que comprende el
15 anticuerpo e instrucciones para emplear el anticuerpo para detectar la proteína de OX40L.

Los anticuerpos de la presente invención son útiles para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades inflamatorias en un mamífero, preferiblemente un
20 paciente sospechoso de tener o sufrir de tal enfermedad. Tales enfermedades incluyen las reacciones alérgicas tales como el asma. Otras aplicaciones son el tratamiento de enfermedades autoinmunes incluyendo la artritis reumatoide.

La invención proporciona además un método para tratar un mamífero que sufre de
25 los trastornos inflamatorios anteriormente mencionados, especialmente de asma y artritis reumatoide.

Preferiblemente los anticuerpos de la presente invención pueden ser empleados para el tratamiento del asma persistente grave en pacientes cuyo síntomas no son
30 adecuadamente controlados con corticosteroides inhalados. La población de pacientes incluye los adultos y adolescentes (12 años de edad y mayores) con asma persistente grave inadecuadamente controlada. El anticuerpo será liberado preferiblemente de forma subcutánea, una vez o dos por mes. El punto final principal será preferiblemente la disminución en las exacerbaciones agudas. Otros
35 puntos finales incluyen el flujo máximo, síntomas del asma durante el día, despertares nocturnos, calidad de vida, visitas a la sala de emergencias, días

124

122

libres de asma, el uso de agonistas beta-2, la reducción o estrechamiento de esteroides y el efecto sobre la hiper-sensibilidad.

5 Es adicionalmente preferido emplear los anticuerpos, de acuerdo con la invención, para monoterapia o en combinación con metotrexato u otros DMARD (Medicamentos Anti-Reumáticos que Modifican la Enfermedad) para el tratamiento de adultos con artritis reumatoide activa de moderada a grave. Este será administrado como inyección subcutánea, cada 2 o 4 semanas. Esta será terapia crónica en pacientes que han fallado con uno o más DMARD. Los puntos
10 finales incluirán la reducción en los signos y síntomas y la inhibición del progreso del daño estructural en pacientes adultos con artritis reumatoide activa. La prevención de la discapacidad, la mejora en los signos y los síntomas medidos por el criterio ACR (ACR20 >60%, ACR50 > 35%, ACR70 > 15%; Índice del American College of Rheumatology; www.rheumatology.com).

15 Una realización adicional de la invención es el uso de los anticuerpos, de acuerdo con la invención, para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de estas enfermedades.

20 La invención también se relaciona con el uso de los anticuerpos, como se definieron anteriormente, para la fabricación de una composición farmacéutica y comprende una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo, de acuerdo con la invención, con una cantidad farmacéuticamente efectiva, opcionalmente junto con una solución amortiguadora y/o un coadyuvante útil para
25 la formulación de anticuerpos para fines farmacéuticos.

La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden tales anticuerpos en un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica puede ser incluida en un artículo de
30 fabricación o kit.

Los anticuerpos, de acuerdo con la invención, son preferiblemente producidos por medios recombinantes. Tales métodos son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procarióticas y
35 eucarióticas con aislamiento posterior del polipéptido del anticuerpo y usualmente purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de proteínas, los ácidos nucleicos que codifican cadenas ligeras y

785

pesadas o fragmentos de las mismas son insertados dentro de vectores de expresión por medio de métodos estándar. La expresión es llevada a cabo en células anfitrión procarióticas o eucarióticas apropiadas como las células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, levadura, o células de E.coli, y el anticuerpo es recuperado a partir de las células (sobrenadante o células después de la lisis).

La producción recombinante de anticuerpos es bien conocida en el estado de la técnica y descrita, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S. C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., y otros, Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., y otros, Arzneimittelforschung 48 (1998) 870-880.

Los anticuerpos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. La purificación es llevada a cabo a fin de eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por medio de técnicas estándar, incluyendo el tratamiento alcalino/SDS, la cromatografía de columna y otras bien conocidas en la técnica. Ver Ausubel, F., y otros, ed., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987).

La expresión en células NS0 es descrita por, por ejemplo, Barnes, L.M., y otros, Cytotechnology 32 (2000) 109-123; y Barnes, L.M., y otros, Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria es descrita por, por ejemplo, Durocher, Y., y otros, Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9. La clonación de dominios variables es descrita por Orlandi, R., y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América 89 (1992) 4285-4289; y Norderhaug, L., y otros, J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87. Un sistema preferido de expresión transitoria (HEK 293) es descrito por Schlaeger, E.-J., y Christensen, K., en Cytotechnology 30 (1999) 71-83 y por Schlaeger, E.-J., en J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199.

Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión del ribosoma. Las células eucarióticas son conocidas por utilizar promotores, intensificadores y señales de poliadenilación.

El ácido nucleico es "operablemente enlazado" cuando este es colocado dentro de una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretorio es operablemente enlazado al ADN para un polipéptido si este es expresado como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador es operablemente enlazado a una secuencia codificadora si este afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión del ribosoma es operablemente enlazado a una secuencia codificadora si este es ubicado a fin de facilitar la translación. Generalmente, "operablemente enlazado" significa que las secuencias de ADN que son enlazadas son contiguas, y, en el caso de un líder secretorio, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no tienen que ser contiguos. El enlazamiento es conseguido por medio de la ligación en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, los adaptadores o enlazadores oligonucleótidos sintéticos son empleados de acuerdo con la práctica convencional.

Los anticuerpos monoclonales son adecuadamente separados del medio de cultivo por medio de procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, la cromatografía de proteínas A-Sefarosa, hidroxilapatita, la electroforesis en gel, dialisis, o la cromatografía de afinidad. El ADN y ARN que codifican los anticuerpos monoclonales es rápidamente aislado y secuenciado empleando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como una fuente de tales ADN y ARN. Una vez aislado, el ADN puede ser insertado dentro de vectores de expresión, los cuales son luego transfectados dentro de las células anfitrión tales como las células HEK 293 células, las células CHO, o las células de mieloma que, de lo contrario, no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos recombinantes monoclonales en las células anfitrión.

Las variantes de secuencias de aminoácidos (o mutantes) de un anticuerpo OX40L humano son preparadas al introducir cambios apropiados de nucleótidos dentro del ADN del anticuerpo, o por medio de síntesis del nucleótido. Tales modificaciones pueden ser llevadas a cabo, sin embargo, solo en un rango muy limitado, por ejemplo, como los descritos anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características del anticuerpo anteriormente mencionadas tales como el isotipo IgG y la unión del epítopo, pero pueden

mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar la purificación.

5 Cualquier residuo de cisterna no involucrado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo anti-OX40L también puede ser sustituido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el enlazamiento cruzado aberrante. Por el contrario, el(los) enlace(s) de cisterna puede ser adicionado al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un
10 fragmento Fv).

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las variantes de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-OX40L son preparadas por medio de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no
15 están limitados a, el aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de las variantes de secuencias de aminoácidos que ocurren de manera natural) o la preparación por medio de mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), la mutagénesis con PCR, y la mutagénesis de cassette de una variante previamente preparada o una versión no variante del anticuerpo anti-OX40L
20 humanizado.

La invención también se relaciona con inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo, de acuerdo con la invención, conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina
25 enzimáticamente activa de origen bacterial, fúngico, de plantas o animal, o fragmentos de la misma), un isótopo radioactivo (esto es, un radioconjugado). Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico son preparados empleando una variedad de agentes bifuncionales de acoplamiento de proteínas tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados
30 bifuncionales de imidoésteres; (tal como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tal como disuccinimidil suberato), aldehidos (tal como glutaraldehido), compuestos bis-azido (tal como bis (p- azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiatrina), diisocianatos (tal como tolieno 2,6- diisocianato), y compuestos de fluor bis-activo (tal como 1,5-
35 difluoro-2,4- dinitrobenzeno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede ser preparada como se describe en Vitetta, E.S., y otros, Science 238 (1987) 1098-1104). El ácido 1- isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminapentaacético

128

etiquetado con carbono 14 (MX-DTPA) en un agente quelante ejemplificante para la conjugación del radionucleótico al anticuerpo. Ver WO 94/11026.

- Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende el enlazamiento del anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilén glicol, polipropilén glicol, o polioxialquilenos, en la forma establecida en las patentes de Estados Unidos Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 o 4,179,337.
- 5
- 10 En aún otro aspecto, la invención proporciona células B aisladas de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, el cual expresa los anticuerpos anti-OX40L humanos (por ejemplo, los anticuerpos precursores producidos por una línea celular seleccionada del grupo que consiste de células de hibridoma que producen anticuerpos de acuerdo con la invención.
- 15 Preferiblemente, las células B aisladas son obtenidas de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, el cual ha sido inmunizado con una forma purificada o recombinante del antígeno de OX40L y/o células que expresan OX40L. Preferiblemente, el animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada
- 20 humano y un transgen de cadena ligera humano que codifican todo o una porción de un anticuerpo de la invención. Las células B aisladas son luego immortalizadas para proporcionar una fuente (por ejemplo, un hibridoma) de anticuerpos anti-OX40L humanos. Por consiguiente, la presente invención también proporciona un hibridoma capaz de producir anticuerpos monoclonales humanos, de acuerdo con
- 25 la invención. En una realización, el hibridoma incluye una célula B obtenida a partir de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico que tenga un genoma que comprenda un transgen humano de cadena pesada y un transgen humano de cadena ligera que codifica todo o una porción de un anticuerpo de la invención, fusionado a una célula immortalizada.
- 30
- En una realización particular, el animal transgénico no humano es un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende un transgen humano de cadena pesada y un transgen humano de cadena ligera que codifican todo o una porción de un anticuerpo de la invención. El animal transgénico no humano puede ser
- 35 inmunizado con una preparación purificada o enriquecida del antígeno OX40L y/o de células que expresan OX40L. Preferiblemente, el animal transgénico no

127

humano, por ejemplo, el ratón transgénico, es capaz de producir isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para OX40L.

5 Los anticuerpos monoclonales humanos, de acuerdo con la invención, pueden ser producidos al inmunizar un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tenga un genoma que comprende un transgen humano de cadena pesada y un transgen humano de cadena ligera que codifica todo o una porción de un anticuerpo de la invención, con una preparación purificada o enriquecida del antígeno OX40L y/o de células que expresan OX40L. Células B 10 (por ejemplo, células B esplénicas) del animal son luego obtenidas y fusionadas con células de mieloma para formar células de hibridoma, inmortales, que secretan anticuerpos monoclonales humanos en contra de OX40L.

15 En una realización preferida, anticuerpos monoclonales humanos dirigidos en contra de OX40L pueden ser generados empleando ratones transgénicos que llevan partes del sistema inmune humano más que del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos, referidos aquí como ratones "HuMAb", contienen un miniloci de genes de inmunoglobulina humanos que codifica genes desordenados de inmunoglobulina humana los cuales incluyen la cadena pesada (μ y γ) y la cadena 20 ligera κ (genes de región constante), junto con mutaciones marcadas como blanco que inactivan el loci endógeno de las cadenas μ y κ (Lonberg, N., y otros, Nature 368 (1994) 856-859). Por consiguiente, los ratones exhiben expresión reducida del IgM o K del ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes introducidos de cadena pesada y ligera humanos sufren de cambio de clase y de mutación 25 somática para generar anticuerpos monoclonales IgG humanos de alta afinidad (Lonberg, N., y otros, Nature 368 (1994) 856-859; revisado en Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113 (1994) 49-101; Lonberg, N., y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 25 (1995) 65-93; y Harding, F., y Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci. 764 (1995) 536-546). La preparación de ratones HuMAb es 30 descrita en Taylor, L., y otros, Nucleic Acids Res. 20 (1992) 6287-6295; Chen, J., y otros, Int. Immunol. 5 (1993) 647-656; Tuaillon, N., y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América 90 (1993) 3720-3724; Choi, T.K., y otros, Nat. Genet. 4 (1993) 117-123; Chen, J., y otros, EMBO J. 12 (1993) 821-830; Tuaillon, N., y otros, J. Immunol. 152 (1994) 2912-2920; Lonberg, N., y otros, Nature 368 (1994) 856-859; Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology (Manual de 35 Farmacología Experimental) 113 (1994) 49-101; Taylor, L., y otros, Int. Immunol. 6 (1994) 579-591; Lonberg, N., y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 25 (1995) 65-93;

130

128

Harding, F., y Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci. 764 (1995) 536-548; Fishwild, D.M., y otros, Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851, los contenidos de todos los cuales son incorporados aquí, en su totalidad, como referencia. Ver además, Patentes de Estados Unidos Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877, 397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 5,545,807; 5,770,429; WO 98/24884; WO 94/25585; WO 93/1227; WO 92/22645; y WO 92/03918.

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para OX40L, los ratones HuMAb pueden ser inmunizados con una preparación purificada o enriquecida de antígeno OX40L y/o células que expresan OX40L de acuerdo con el método general, como se describe por Lonberg, N., y otros, Nature 368 (1994) 856-859; Fishwild, D.M., y otros, Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851 y WO 98/24884. Preferiblemente, los ratones serán de 6-16 semanas de edad con la primera inmunización. Por ejemplo, una preparación purificada o enriquecida del antígeno OX40L soluble (por ejemplo, purificado a partir de células que expresan OX40L) acoplado a KLH o en PBS puede ser empleada para inmunizar los ratones HuMAb intraperitonealmente. Esta puede ser combinada por inmunización alternativa con la proteína de OX40L aislada con células que expresan OX40L, por ejemplo, una línea celular tumoral, para promover respuestas inmunes. La experiencia acumulada con diversos antígenos ha demostrado que los ratones HuMAb transgénicos responden mejor cuando son inicialmente inmunizados intraperitonealmente (i.p.) con antígeno en coadyuvante completo de Freund, seguido por inmunizaciones i.p. cada dos semanas (por ejemplo, hasta un total de 6) con antígeno en coadyuvante incompleto de Freund. La respuesta inmune puede ser monitoreada durante el curso del protocolo de inmunización con muestras de plasma que son obtenidas por medio de sangrados retroorbitales. El plasma puede ser elegido por medio de ELISA, y los ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina humana anti-OX40L pueden ser empleados para la inmortalización de las células B correspondientes. Los ratones pueden ser estimulados intravenosamente con antígeno de 3 a 4 días antes del sacrificio y remoción del bazo y los ganglios linfáticos. Varios ratones serán inmunizados por cada antígeno. Por ejemplo, un total de doce ratones HuMAb de las cepas HCo7 y HCo12 pueden ser inmunizados.

Los ratones HCo7 tienen una disrupción JKD en sus genes endógenos de cadena ligera (kappa) (como se describe en Chen, J., y otros, EMBO J. 12 (1993) 821-830), una disrupción CMD en sus genes endógenos de cadena pesada (como se

134

describió en el Ejemplo 1 de WO 01/14424), un transgen humano de cadena ligera kappa (como se describió en Fishwild, D.M., y otros, Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851), y un transgen humano de cadena pesada HCo7 (como se describió en la Patente de Estados Unidos No. 5,770,429).

5

Los ratones HCo12 tienen una disrupción JKD en sus genes endógenos de cadena ligera (kappa) (como se describió en Chen, J., y otros, EMBO J. 12 (1993) 821-830), una disrupción CMD en sus genes endógenos de cadena pesada (como se describió en el Ejemplo 1 de WO 01/14424), un transgen humano de cadena ligera kappa (como se describió en Fishwild, D.M., y otros, Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851), y un transgen humano de cadena pesada HCo12 (como se describió en el Ejemplo 2 de WO 01/14424). Los linfocitos del ratón pueden ser aislados y fusionados con una línea celular de mieloma de ratón empleando PEG basado en protocolos estándar para generar hibridomas. Los hibridomas resultantes son luego barridos para la producción de anticuerpos específicos del antígeno. Por ejemplo, suspensiones celulares sencillas de linfocitos esplénicos y derivados del ganglio linfático a partir de ratones son fusionadas a un sexto del número de células de mieloma de ratón no secretoras SP 2/0 (ATCC, CRL 1581) con PEG al 50%. Las células son colocadas en placas en aproximadamente 2×10^5 en placas de microtítulos de base plana, seguidas por alrededor de dos semanas de incubación en medio selectivo.

Los pozos individuales son luego barridos por medio de ELISA para anticuerpos IgM e IgG monoclonales anti-OX40L humanos. Una vez que ocurre el crecimiento extensivo del hibridoma, el medio es analizado, usualmente después de 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpo son reubicados en otra placa, barridos de nuevo, y si aún son positivos para anticuerpos IgG humanos, monoclonales anti-OX40L, pueden ser subclonados al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables son luego cultivados in vitro para producir el anticuerpo en el medio de cultivo del tejido para caracterización.

El árbol de ensayos principalmente esta compuesto de un ensayo no específico de IgG ("IgG-ELISA") seguido por un ELISA específico y ensayo FACS aparente para la determinación del antígeno que se une a ya sea la proteína OX40L purificada o a las células que expresan OX40L. La siguiente etapa comprende los ensayos funcionales en donde se determina la competencia del anticuerpo anti OX40L con su compañero natural de interacción, por ejemplo, OX40 soluble,

purificado para ya sea el OX40L purificado u OX40L expresado en células, por ejemplo, ELISA o FACS de competencia. La siguiente etapa comprende un ensayo funcional en donde se determina la capacidad de bloqueo del anticuerpo anti-OX40L de la transducción de señal de OX40, por ejemplo, activación de NFκB (= "ensayo de NFκB"). La siguiente etapa comprende ensayos funcionales en donde se determina la capacidad de bloqueo del anticuerpo anti-OX40L que concierne a la activación de las células T ("ensayo de activación de células T" y "ensayo TT").

10 Debido a que las secuencias de CDR son responsables de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes, de acuerdo con la invención, al construir vectores de expresión que incluyen las secuencias de CDR, de acuerdo con la invención, sobre secuencias marco provenientes de un anticuerpo humano diferente (ver, por ejemplo, Riechmann, L., y otros, Nature 332 (1998) 323-327; Jones, P., y otros, Nature 321 (1986) 522-525; y Queen, C, y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América 86 (1989) 10029- 10033). Tales secuencias marco pueden ser obtenidas a partir de bases de datos públicas de ADN que incluyen secuencias de genes de líneas germinales de anticuerpos humanos. Estas secuencias de líneas germinales diferirán de las secuencias de genes maduros de anticuerpos debido a que ellas no incluirán los genes variables completamente montados, los cuales son formados por V(D)J que se unen durante la maduración de las células B. Las secuencias de genes de líneas germinales también diferirán de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad en el individuo regularmente al otro lado de la región variable.

La invención comprende además el uso de un anticuerpo, de acuerdo con la invención, para el diagnóstico del OX40L in vitro, preferiblemente por un ensayo inmunológico que determina la unión entre OX40L (ya sea soluble o enlazado a la membrana) de una muestra y el anticuerpo, de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales humanos, o la porción que se une al antígeno de los mismos, de la presente invención, formulada junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Más específicamente, la composición es una composición farmacéutica o una de diagnóstico y aún más específicamente la

composición farmacéutica comprende un anticuerpo como se definió anteriormente y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición debe ser estéril y fluida hasta el grado en el que la composición sea entregada por medio de jeringa.

5

Tal como se emplea aquí, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacteriales y antifúngicos, agentes de retardo isotónicos y de absorción, y los similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el portador es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Preferiblemente tal portador es una solución acuosa amortiguadora de pH (por ejemplo acetato, citrato, fosfato o histidina), preferiblemente isotónica, preferiblemente que contiene además una sal inorgánica, azúcar, poliol y/o un tensoactivo. Los portadores farmacéuticamente aceptables son también tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences (Ciencias Farmacéuticas de Remington), 16ª Edición, Osol, A. Ed. (1980).

La concentración de anticuerpo es preferiblemente de 0.1 mg/ml a 50 mg/ml. Preferiblemente el valor de pH de la solución amortiguadora oscila de 4.0 a 8.0 en una concentración de solución amortiguadora de 1 mM a 200 mM. Las sales preferidas son cloruro de sodio y/o fosfato de sodio en el rango de 1mM a 200 mM. Los azúcares preferidos son sucrosa y/o trehalosa en el rango de 1% a 15% (p/v). Los polioles preferidos son glicerol, propilen glicol, polietilen glicol líquido y/o los similares en el rango de 1% a 15% (p/v). El tensoactivo es preferiblemente un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20 u 80) y/o poloxámero en el rango de 0.001% a 0.5% (p/v). Una composición farmacéutica preferida contiene anticuerpo de 0.1 mg/ml a 50 mg/ml y 1mM a 200 mM de salina de fosfato amortiguada a pH 4.0 a 8.0.

30

Una composición de la presente invención puede ser administrada por una variedad de métodos conocidos en la técnica a un paciente con la necesidad de los mismos. Como será apreciado por la persona versada en la materia, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados.

35

Los excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles o polvos estériles para la preparación extemporánea de

soluciones inyectables o dispersión estériles. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica.

5 **Las frases "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" tal como se emplean aquí significan modos de administración diferentes del enteral y la administración tópica, usualmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyecciones e infusiones intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide,**
10 **intraespinal, epidural e intraesternal.**

15 **Los niveles reales de dosificación de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser variados a fin de obtener una cantidad del ingrediente activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición, y modo de administración particulares, sin ser tóxicos para el paciente. El nivel seleccionado de dosis dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida de los mismos, la ruta de administración, el tiempo de**
20 **administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que es empleado, la duración del tratamiento, otros medicamentos, compuestos y/o materiales empleados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, peso, condición, salud general e historia médica previa del paciente a ser tratado, y factores similares bien conocidos en las artes**
25 **médicas. Una dosificación semanal típica puede oscilar de alrededor de 0.1 mg/kg a alrededor de 20 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente.**

30 **Los siguientes ejemplos, referencias, listado de secuencias y figuras son proporcionadas para ayudar al entendimiento de la presente invención, el verdadero alcance de la cual es establecido en las reivindicaciones anexas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos establecidos sin apartarse del espíritu de la invención.**

35 **Breve Descripción de los Dibujos**

Apr

133

- Fig. 1a: muestra "ELISA de unión" para TAG-34, LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033.
- Fig. 1b: muestra "ELISA de bloqueo" datos + IC50 para TAG-34, LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033.
- 5 Fig. 2: muestra "FACS de bloqueo" para TAG-34, LC.001, LC.005.
- Fig. 3: muestra "ensayo de NFκB" para TAG-34, LC.001, LC.019 y LC.024 (sin unión del anticuerpo).
- Figs. 4 y 5: muestran "ensayo de activación de las células T" y valores IC50 para TAG-34, LC.001 y LC.005 (Fig 4: liberación de IL, Fig. 5: inhibición).
- 10 Fig. 6: muestra los datos del "ensayo TT" para TAG-34, LC.001 y LC.033.
- Fig. 7: muestra la reactividad cruzada de los anticuerpos de la invención con OX40L de ratón. A) control para la expresión de hOX40L en células transfectadas y WT, B) la unión de los anticuerpos a las células K562 que expresan hOX40L, C) control para la expresión de mOX40L en células transfectadas y WT, D) la unión de los anticuerpos a células K562 que expresan mOX40L, y E) la unión de los anticuerpos a células WT K562 (n=3).
- 15 Fig. 8: muestra la capacidad de los anticuerpos de la invención para unirse al C1q (n=3).
- 20 Fig. 9: muestra la capacidad de los anticuerpos de la invención para activar C3c (n=3).
- Fig. 10: muestra la capacidad de los anticuerpos de la invención para unirse a FcγRI (n=4), FcγRIIa (n=4) y FcγRIIb (n=4).
- Fig. 11: muestra la capacidad de los anticuerpos de la invención para unirse a FcγRIIIa (CD16) en células NK (Promedio ± SEM de 6 donantes).
- 25 Fig. 12: Inmunoelctrotransferencia (Western Blot); carriles 1, 4, 7: marcador; carriles 2, 5, 8: 100 ng OX40L; carriles 3, 6, 9: 40 ng OX40L.

30 Descripción del Listado de Secuencias

- SEQ ID NO:1 región variable de la cadena ligera kappa de LC.001
- SEQ ID NO:2 región variable de la cadena pesada γ de LC.001
- SEQ ID NO:3 región variable de la cadena ligera kappa de LC.005
- 35 SEQ ID NO:4 región variable de la cadena pesada γ de LC.005
- SEQ ID NO:5 región variable de la cadena ligera kappa de LC.010

136

134

- SEQ ID NO:6 región variable de la cadena pesada y de LC.010
- SEQ ID NO:7 región variable de la cadena ligera kappa de LC.029
- SEQ ID NO:8 región variable de la cadena pesada y de LC.029
- SEQ ID NO:9 región variable de la cadena ligera kappa de LC.019
- 5 SEQ ID NO:10 región variable de la cadena pesada y de LC.019
- SEQ ID NO: 11 región variable de la cadena ligera kappa de LC.033
- SEQ ID NO:12 región variable de la cadena pesada y de LC.033
- SEQ ID NO: 13 región constante de la cadena ligera kappa
- SEQ ID NO:14 región constante de la cadena pesada y1
- 10 SEQ ID NO: 15 región constante de la cadena pesada y4
- SEQ ID NO:16 región variable mutante de la cadena ligera kappa de LC.033
- SEQ ID NO: 1 región variable de la cadena ligera kappa de LC.059
- SEQ ID NO:17 región variable de la cadena pesada y de LC.059
- SEQ ID NO: 18 región variable de la cadena ligera kappa de LC.060
- 15 SEQ ID NO: 19 región variable de la cadena pesada y de LC.060
- SEQ ID NO: 1 región variable de la cadena ligera kappa de LC.063
- SEQ ID NO:20 región variable de la cadena pesada y de LC.063
- SEQ ID NO:21-57 secuencias CDR
- SEQ ID NO:58 cadena pesada y de LC.001 (tipo IgG1 humano)
- 20 SEQ ID NO:59 cadena pesada y de LC.001 (L234A, L235A IgG1 humano mutante)
- SEQ ID NO:60 cadena pesada y de L.001 (S228P IgG4 humano mutante)
- SEQ ID NO:61 cadena ligera kappa de LC.001
- SEQ ID NO:62 cadena pesada y de LC.005 (tipo IgG1 humano)
- 25 SEQ ID NO:63 cadena pesada y de LC.005 (L234A, L235A IgG1 humano mutante)
- SEQ ID NO:64 cadena pesada y de LC.005 (S228P IgG4 humano mutante)
- SEQ ID NO:65 cadena ligera kappa de LC.005
- SEQ ID NO:66 cadena pesada y de LC.060 (tipo IgG1 humano)
- 30 SEQ ID NO:67 cadena pesada y de LC.060 (L234A, L235A IgG1 humano mutante)
- SEQ ID NO:68 cadena pesada y de LC.060 (S228P IgG4 humano mutante)
- SEQ ID NO:69 cadena ligera kappa de LC.060
- 35 Abreviaturas:

137

135

Los aminoácidos son abreviados ya sea en el código de tres letras (Leu) o de una letra (L).

S228P significa un intercambio de Serina a Prolina en la posición 228 de la cadena pesada IgG4.

5 L234 significa el aminoácido leucina en la posición 234 de acuerdo con la numeración EU (Kabat).

L234A significa el aminoácido leucina en la posición 234 es cambiado a alanina.

L235A significa el aminoácido leucina en la posición 235 es cambiado a alanina.

10 PVA236 significa que en el 236 de la región ELLG de IgG1 o EFLG de IgG4 es modificado en PVA.

GLPSS331 significa que en el 331 de la región ALPAP de IgG1 o GLPAP de IgG2 es cambiado a GLPSS.

Delta G236 significa que el aminoácido en la posición 236 es eliminado.

IgG4x significa mutación S228P en IgG4.

15 LC2010-001 es un sinónimo para LC.001

Fcg es sinónimo para Fcgamma (Fcγ)

Otras enmiendas de la secuencia de los anticuerpos son designadas de manera análoga.

20

OX40L recombinante soluble humano hOX40L-His
fusionado a una etiqueta de Histidina

OX40L recombinante soluble murino mOX40L-His
fusionado a una etiqueta de Histidina

25 OX40L recombinante soluble humano hOX40L-Bandera
fusionado a una etiqueta de Bandera

OX40L recombinante soluble murino mOX40L-Bandera
fusionado a una etiqueta de Bandera

OX40 recombinante soluble humano hOX40 -hFc
30 fusionado a Fcγ humano

Anticuerpo monoclonal Fcγ anti-murino Anti-mFc
de conejo

Anticuerpo monoclonal Fcγ anti-humano Anti-hFc
de cabra

35 Anticuerpo monoclonal anti-histidina Anti-His
murino

OX40 recombinante soluble humano hOX40 -mFc

126

136

	fusionado a Fcy murino	
	Anticuerpo monoclonal anti-TNF α	Anti-TNF α
	murino	
	Anticuerpo monoclonal anti-CD40L	Anti-CD40L
5	murino	
	Factor de Necrosis Tumoral alfa	TNF α
	Ligando CD40	CD40L
	Anticuerpo monoclonal anti-OX40L	TAG34
	humano de rata	
10	Anticuerpos monoclonales humanos anti-OX40L humano	LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033, LC059, LC.060, LC063
15	Fitohemaglutinina	PHA

20

EJEMPLOS

Ejemplo 1

25 Generación de una línea celular de hibridoma que produce anticuerpos anti-OX40L

Cultivo de hibridomas

30 Los hibridomas de HuMab fueron cultivados en IMDM (Cambrex), suero Bovino Fetal del clón 1 (Perbio Science), factor de clonación de origen Hibridoma (Igen), piruvato de sodio, penicilina/estreptomicina, 2-mercaptostanol, HAT (Sigma-Aldrich) y Canamicina (Invitrogen) en 37°C y CO₂ al 5%.

35 Procedimiento de inmunización de ratones transgénicos

139

LC2010-001: Seis HCo7 (2 machos y 4 hembras), cepa GG2201 (Medarax, San Jose, CA, Estados Unidos de América), y 4 HCo12 (4 machos), cepa GG2198 (Medarax, San Jose, CA, Estados Unidos de América) fueron alternadamente inmunizados con 1×10^6 células HEK293, transitoriamente transfectadas con un vector de expresión para OX40L humano (hOX40L), y 20 μg de dominio soluble extracelular de hOX40L. Ocho inmunizaciones fueron llevadas a cabo en total, cuatro inmunizaciones intraperitoneales (i.p.) con las células que expresan el hOX40L y cuatro inmunizaciones subcutáneas (s.c.) en la base de la cola con la proteína recombinante. Para la primera inmunización, 100 μl de 1×10^6 células HEK293-hOX40L fueron mezclados con 100 μl de coadyuvante completo de Freund (CFA; Difco Laboratories, Detroit, Estados Unidos de América). Para todas las otras inmunizaciones, 100 μl de células en PBS fueron empleadas o la proteína recombinante fue mezclada con 100 μl de coadyuvante incompleto de Freund (ICFA; Difco).

15 Cuando se encontró que los títulos de suero de anti-hOX40L eran suficientes, los ratones fueron adicionalmente estimulados dos veces con 15 μg de dominio extracelular de hOX40L en 200 μl de PBS intravenosamente (i.v.) 4 y 3 días antes de la fusión.

20 LC2010-001, LC.059, LC.060 y LC.063 fueron derivados de ratones HCo12.

LC2010-005, -010, -019, -029 y -033: Cinco HCo7 (4 machos y 1 hembra), cepa GG2201 (Medarax, San Jose, CA, Estados Unidos de América) fueron 25 inmunizados con 20 μg de dominio extracelular soluble de hOX40L. Siete inmunizaciones fueron llevadas a cabo en total, cuatro intraperitoneales (i.p.) y tres inmunizaciones subcutáneas (s.c.) en la base de la cola. Para la primera inmunización, 100 μl de proteína recombinante fue mezclada con 100 μl de coadyuvante completo de Freund (CFA; Difco Laboratories, Detroit, Estados Unidos de América). Para todas las otras inmunizaciones, 100 μl de proteína recombinante fue mezclada con 100 μl de coadyuvante incompleto de Freund (ICFA; Difco).

35 Cuando se encontró que los sueros del título de anti-hOX40L eran suficientes, los ratones fueron adicionalmente estimulados dos veces con 15 μg de dominio

extracelular de hOX40L en 200 µl de PBS intravenosamente (i.v.) 4 y 3 días antes de la fusión.

Generación del hibridoma

5

Los ratones fueron sacrificados y el bazo y ganglio linfáticos que flanquean la aorta abdominal y la vena cava fueron recolectados. La fusión de los esplenocitos y las células del ganglio linfático con las células compañeras de fusión SP 2.0 fue llevada a cabo de acuerdo con procedimientos estándar de operación.

10

ELISA específico del antígeno

Los títulos de anti-OX40L en sueros de ratones inmunizados fueron determinados por ELISA específico del antígeno. La placa (placa 96 de ELISA de base plana, Greiner) fue recubierta con 0.1 µg/ml del OX40L purificado disuelto en PBS y recubierta durante la noche a temperatura ambiente.

Después de eso, los pozos fueron bloqueados con PBSTC (PBS que contiene Tween 20 al 0.05% (Sigma- Aldrich Chemie BV) y 2% de suero de pollo (Gibco)) por 1 hora a temperatura ambiente.

Los tapones de suero probados fueron diluidos 1:50 en PBSTC y adicionados a los pozos. El suero obtenido a partir de ratones antes de la inmunización fue disuelto 1:100 en PBSTC y empleado como control negativo. Un anticuerpo de ratón dirigido contra el OX40L humano fue disuelto 1:50 en PBSTC y empleado como un control positivo. Las placas fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas fueron lavadas dos veces empleando PBST (PBS que contiene Tween 20 al 0.05%. Gt-α-hulgG-HRP (Jackson) fue diluido 1:5000 en PBSTC y adicionado a los pozos que contienen los tapones probados y el control negativo. Rb-α-mIgG (Jackson) fue diluido 1:3000 en PBSTC y adicionado a los pozos que contienen el control positivo. Las placas fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las placas fueron lavadas tres veces empleando PBST y desarrolladas con solución ABTS® recién preparada (1 mg/ml) (ABTS: 2,2'-azino bis (ácido 3-etilbenztiazolin-6-sulfónico) por 30 minutos a temperatura ambiente (RT) en la oscuridad. La absorbancia fue medida a 405 nm.

ELISA de kappa

Para determinar si los hibridomas que resultaron a partir de la fusión generaron anticuerpos humanos, se llevó a cabo un ELISA de kappa. Las placas de ELISA fueron recubiertas con anticuerpo IgG de cadena ligera kappa anti-humano de rata (DAKO) diluido 1/10000 en PBS por incubación durante la noche a 4°C. Después de descartar los pozos, las placas fueron bloqueadas por incubación con PBSTC (PBSC, complementado con Tween-20 al 0.05% (PBSTC)) por 1 hora a temperatura ambiente. Después de eso, los pozos fueron incubados con el sobrenadante del cultivo de hibridoma, diluidos 1/2 en PBSTC. El medio de cultivo diluido 1/2 en PBSTC fue empleado como control negativo, el suero de ratón ligero-kappa positivo diluido 1/100 en PBSTC sirvió como control positivo. Posteriormente, los pozos fueron lavados tres veces y fueron incubados con IgG F(ab')₂ anti-humano de rata conjugado con HRP (DAKO), diluido 1/2000 en PBSTC por 1 h a 37°C. Los pozos fueron lavados tres veces y los ensayos fueron desarrollados con solución ABTS® recién preparada (1 mg/ml) por 30 minutos a temperatura ambiente (RT) en la oscuridad. La absorbancia fue medida a 405 nm en un lector de placas de ELISA.

20

Ejemplo 2

Clonación y análisis de secuencias de dominios variables de HuMab anti-OX40L

(cadenas ligera - kappa y pesada - γ 1)

25

Las secuencias de nucleótidos que codifican para la región variable de la cadena ligera V_L y la región variable de la cadena pesada V_H de los HuMabs de OX40L fueron aislados por medio de una síntesis de ADNc / procedimiento PCR estándares.

30

El ARN total fue preparado a partir de 1×10^6 – 1×10^7 células de hibridoma empleando el kit GeneRacer™ (Invitrogen). El ARN derivado del Hibridoma fue empleado como una plantilla para la síntesis de la 1^{era} hebra del ADNc y la ligación del Cebador Oligo-dT del GeneRacer™. La síntesis de la 2^{da} hebra del ADNc y la amplificación adicional por PCR de V_L y V_H que codifican los fragmentos del ADNc fueron llevadas a cabo con cebadores inversos d cadenas ligera y pesada complementarios a las secuencias de nucleótidos de la región

constante de la cadena pesada- $\gamma 1$ y ligera-kappa y los cebadores específicos 5' de GeneRacer™, respectivamente. Los productos de la PCR fueron clonados empleando el kit de clonación TA TOPO™ de Invitrogen™ Life Technologies y pCR4-TOPO™ como un vector de clonación. Los productos de la PCR clonados
5 fueron identificados por medio de mapeo de restricción de los plásmidos apropiados empleando EcoRI para la digestión y el fragmento de ADN esperado / calculado mide de alrededor de 740 y 790 bp para V_L y V_H , respectivamente.

La secuencia de ADN de los fragmentos de PCR clonados fue determinada por
10 secuenciamiento de la hebra doble.

La versión 10.2 del paquete de programa de computador GCG (Genetics
Computer Group, Madison, Wisconsin) y el Vector-NTI 8 (InforMax, Inc) fue
empleada para el procesamiento general de datos. Las secuencias de ADN y
15 proteínas fueron alineadas empleando el CLUSTALW modulo GCG. Los
alineamientos de las secuencias fueron realizados empleando el programa
GENEDOC (versión 2.1).

Ejemplo 3

20 Construcción de plásmidos de expresión para un HuMab IgG1 anti-OX40L

Los genes que codifican las cadenas ligera y pesada del HuMab anti-OX40L
fueron separadamente montados en vectores de expresión de células de
mamíferos.

25

De ese modo, los segmentos de genes que codifican la región variable de cadena
ligera (V_L) del HuMab anti-OX40L y la región constante de cadena ligera - kappa
humana (C_L , SEQ ID NO:13, o fuera de SEQ ID NO: 61, 65 o 69) fueron unidos
como lo fueron los segmentos de genes para la región variable de cadena pesada
30 (V_H) de HuMab anti-OX40LHuMab y la región constante de cadena pesada - $\gamma 1$
humana (C_{H1} -Región Bisagra- C_{H2} - C_{H3} , SEQ ID NO: 14, o fuera de SEQ ID NO:58,
62 o 66).

Información general con respecto a las secuencias de nucleótidos de cadenas
35 ligeras y pesadas humanas a partir de las cuales se puede deducir el uso del
codón se da en: Kabat, E.A., y otros, Sequences of Proteins of Immunological

143

Interest (Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico), 5ª Edición, NIH Publication No. 91- 3242 (1991).

5 La unidad de transcripción de la cadena ligera – kappa del HuMab anti-OX40L está compuesta de los siguientes elementos:

- El intensificador y promotor anticipados inmediatos provenientes del citomegalovirus humano (HCMV),
- Una 5'-UT sintética que incluye una secuencia Kozak,
- 10 - Una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina que incluye el intrón de la secuencia de señal,
- El ADNc de cadena ligera variable del HuMab anti-OX40L clonado arreglado con un sitio de restricción BsmI único en el extremo 5' y un sitio donante de empalme y un sitio de restricción NotI único en el extremo 3',
- 15 - La región genómica constante de genes – kappa humana, que incluye el intensificador Kappa – Ig de ratón del intron 2 [Picard, D., y Schaffner, W., Nature 307 (1984) 80-82] y
- La secuencia de señal de poliadenilación ("poli A") de inmunoglobulina - kappa humana.

20

La unidad de transcripción de la cadena pesada - $\gamma 1$ del HuMab anti-OX40L está compuesta de los siguientes elementos:

- El intensificador y promotor anticipados inmediatos provenientes del citomegalovirus humano (HCMV),
- 25 - Una 5'-UT sintética que incluye una secuencia Kozak,
- Una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina modificada que incluye el intrón de la secuencia de señal,
- El ADNc de cadena pesada variable del HuMab anti-OX40L clonado arreglado con un sitio de restricción BsmI único en el extremo 5' y un sitio donante de empalme y un sitio de restricción NotI único en el extremo 3',
- 30 - La región genómica constante de genes pesados - $\gamma 1$ humana, que incluye el intensificador μ - Ig de ratón (Neuberger, M.S., EMBO J. 2 (1983) 1373-1378),
- 35 - La secuencia de señal de poliadenilación ("poli A") de inmunoglobulina - $\gamma 1$ humana.

Los elementos funcionales de los plásmidos de expresión de la cadena pesada - $\gamma 1$ y de la cadena ligera - kappa del HuMab anti-OX40L: Comparado con el cassette de expresión de la cadena pesada - $\gamma 1$ o de la cadena ligera - kappa del HuMab anti-OX40L, estos plásmidos contienen

5

- Un gen de resistencia a la higromicina
- Un origen de replicación, oriP, del virus de Epstein Barr (EBV)
- Un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en E. coli, y

- 10 - Un gen de β -lactamasa el cual confiere resistencia a la ampicilina en E. coli.

Ejemplo 4

Construcción de plásmidos de expresión para un HuMab de IgG4 anti-OX40L

- 15 Un plásmido de expresión prototipo de cadena pesada - $\gamma 4$ anti-OX40L fue derivado del plásmido de expresión de cadena pesada - $\gamma 1$ anti-OX40L al reemplazar la región constante - $\gamma 1$ genómica humana y la secuencia de señal de poliadenilación ("poli A") de inmunoglobulina - $\gamma 1$ por la región constante - $\gamma 4$ genómica humana (SEQ ID NO:15 o fuera de la región constante - $\gamma 4$ sin mutar
- 20 fuera de SEQ ID NO:60, 64 o 68) y la secuencia de señal de poliadenilación de inmunoglobulina $\gamma 4$.

- Para la expresión de las cadenas ligeras - kappa del HuMab anti-OX40L, los mismos plásmidos de expresión fueron empleados como se describió para IgG1
- 25 (ver arriba).

Ejemplo 5

Construcción de plásmidos de expresión para IgG1 e IgG4 anti-OX40L mutantes (variantes) con base en LC.001

30

- Los plásmidos de expresión que codifican las cadenas pesada - $\gamma 1$ y - $\gamma 4$ anti-OX40L mutantes fueron creadas por medio de mutagénesis dirigida al sitio de los plásmidos de expresión de tipo natural empleando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange™ (Stratagene). Los aminoácidos son numerados de acuerdo
- 35 con la numeración EU (Edelman, G. M., y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., y otros, Sequences of Proteins

of Immunological Interest (Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico), 5ª Edición, Public Health Service, NIH Publication No. 91- 3242, Bethesda, MD (1991)).

5

Tabla 1

Isotipo	Abreviatura	Mutaciones	Descripción
IgG1	IgG1v1	PVA-236; GLPSS331 , como se específico por E233P; L234V; L235A; delta G236; A327G; A330S; P331S	La secuencia de aminoácidos Glu ₂₃₃ Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ Gly ₂₃₆ de la cadena pesada - γ1 humana es reemplazada por la secuencia de aminoácidos Pro ₂₃₃ Val ₂₃₄ Ala ₂₃₅ de la cadena pesada - γ2 humana. La secuencia de aminoácidos Ala ₃₂₇ Leu ₃₂₈ Pro ₃₂₉ Ala ₃₃₀ Pro ₃₃₁ de la cadena pesada - γ1 humana es reemplazada por la secuencia de aminoácidos Gly ₃₂₇ Leu ₃₂₈ Pro ₃₂₉ Ser ₃₃₀ Ser ₃₃₁ de la cadena pesada - γ4 humana.
IgG1	IgG1v2	L234A; L235A	La secuencia de aminoácidos Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ de la cadena pesada - γ1 humana es reemplazada por la secuencia de aminoácidos Ala ₂₃₄ Ala ₂₃₅
IgG4	IgG4v1	S228P; L235E	Ser ₂₂₈ de la cadena pesada - γ4 humana es reemplazada por Pro ₂₂₈ y Leu ₂₃₅ de la cadena pesada - γ4 humana es reemplazada por Glu ₂₃₅
IgG4	IgG4x	S228P	Ser ₂₂₈ de la cadena pesada - γ4 humana es reemplazada por Pro ₂₂₈

Ejemplo 6

Producción de HuMabs anti OX40L recombinantes

10

Los HuMabs recombinantes fueron generados por medio de transfección transitoria de células adherentes HEK293-EBNA (ATTC CRL-10852) cultivados en DMEM (Gibco) complementado con FCS de IgG ultra bajo al 10% (Gibco),

Glutamine 2 mM (Gibco), aminoácidos no esenciales al 1% v/v (Gibco) y G418 de 250 µg/ml (Roche). Para la transfección se empleó el Reactivo de Transfección Fugene™ 6 (Roche) en una proporción de reactivo (µl) a ADN (µg) que oscila entre 3:1 to 6:1. Las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina fueron expresadas de dos plásmidos diferentes empleando una proporción molar del plásmido que codifica de cadena ligera a cadena pesada de 1:2 a 2:1. Los sobrenadantes del cultivo celular que contiene el HuMab fueron cosechados en el día 4 al 11 después de la transfección. Los sobrenadantes fueron almacenados a -20 °C hasta la purificación.

10

La información general con respecto a la expresión recombinante del anticuerpo humano en, por ejemplo, HEK293 es dada en: Meissner, P., y otros, Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203.

15 Ejemplo 7

Análisis de afinidad de los anticuerpos TAG34, LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033

Instrumento: Biacore 3000, solución amortiguadora de corrida y reacción: HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.005%, ph 7.4), 25°C. La inyección del analito fue llevada a cabo a 7 concentraciones entre 0.78 nM y 100 nM por 3 minutos y lavadas con HBS-P por 5 minutos. La regeneración de la superficie (superficie de dextrano carboximetilado, CM) fue llevada a cabo por medio de dos inyecciones de Glicina 10 mM pH 2.0 por 1 minuto cada una. El chip, el formato y la secuencia del ensayo de las inyecciones y los datos cinéticos corresponden a la descripción en la siguiente tabla. Los datos cinéticos fueron calculados por ajuste de los datos cinéticos a un modelo de unión de Langmuir 1:1.

Tabla 2

30

Chip	Captura	Ligando	Analito	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
CM5	Anti-mFcg	TAG34	hOX40L-His	8.84x10 ⁴	3.32x10 ⁻⁵	3.75x10 ⁻¹⁰
CM5	Anti-hFcg	LC.001	hOX40L-His	9.01x10 ⁴	7.16x10 ⁻⁵	<1.1x10 ⁻¹¹
CM5	Anti-hFcg	LC.005	hOX40L-His	6.84x10 ⁴	2.02x10 ⁻⁷	<1.5x10 ⁻¹¹
CM5	Anti-hFcg	LC.010	hOX40L-His	6.25x10 ⁴	2.5x10 ⁻⁵	3.99x10 ⁻¹⁰
CM5	Anti-hFcg	LC.019	hOX40L-His	7.89x10 ⁴	7.53x10 ⁻⁵	<1.2x10 ⁻¹¹

CM5	Anti-hFcγ	LC.029	hOX40L-His	1,41x10 ⁵	2,4x10 ⁻⁸	<7,1x10 ⁻¹²
CM5	Anti-hFcγ	LC.033	hOX40L-His	7.01x10 ⁴	2.09x10 ⁻⁷	<1.4x10 ⁻¹¹

Ninguna interacción entre TAG34 y mOX40L pudo ser medida.

Evaluación de los Datos y Depósito de los Datos para todos los ensayos Biacore

5

Los datos del control negativo (por ejemplo, las curvas de la solución amortiguadora) fueron sustraídos de las curvas de las muestras para la corrección del flujo de la línea base intrínseca del sistema y para la reducción de la señal de ruido. La version 4.01 de BiaEvaluation fue empleada para el análisis de los sensorgramas y para el cálculo de los datos de afinidad.

10

Ejemplo 8

Ensayo de competencia inhibitoria de los anticuerpos anti-hOX40L que inhiben la interacción del hOX40L con el hOX40 inmovilizado

15

Instrumento: Biacore 3000, solución amortiguadora de corrida y de reacción: HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.005%, ph 7.4), 25°C Antes de la inyección, el analito (10 nM) y el competidor (ocho concentraciones entre 0.78 nM y 100 nM) fueron preincubados por al menos 20 minutos a 22°C. La inyección del analito ± el competidor fue llevada a cabo por 3 minutos y lavada con HBS-P por tres minutos. La regeneración de la superficie fue llevada a cabo por medio de dos inyecciones de Glicina 10 mM pH 2.0 por 1 minuto cada una. El chip, el formato y la secuencia del ensayo de las inyecciones y los datos cinéticos corresponden a la descripción en la siguiente tabla 3.

20

25

Tabla 3

Chip	Ligando	Analito	Competidor	IC50 (M)
CM5	OX40-hFc	hOX40L-His	TAG34	7x10 ⁻⁹
CM5	OX40-hFc	hOX40L-His	LC.001	4x10 ⁻⁹
CM5	OX40-hFc	hOX40L-His	LC.005	3x10 ⁻⁹

Todos los anticuerpos inhiben la unión del OX40L al OX40 en solución (afinidad de solución). LC.001 y LC.005 exhiben un valor IC50 inferior que TAG34.

30

Ejemplo 9

Caracterización del epítipo de los anticuerpos anti-OX40L TAG34, LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033, LC.080

5 Instrumento: Biacore 3000, solución amortiguadora de corrida y de reacción: HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.005%, ph 7.4), 25°C. Los grupos de epítipo fueron determinados por medio de competencia cruzada entre los anticuerpos listados. Antes de la inyección, el analito (50 nM) y el competidor (100
10 nM) fueron preincubados por al menos 20 minutos a 22°C. La inyección del analito ± el competidor por dos minutos, lavados con HBS-P por tres minutos. La regeneración de la superficie fue llevada a cabo por medio de dos inyecciones de Glicina 10 mM pH 2.0 por 1 minuto cada una. El chip, el formato y la secuencia del ensayo de las inyecciones y los datos cinéticos corresponden a la descripción en
15 la siguiente tabla 4.

Tabla 4

Chip	Captura	Ligando	Analito	Competidor	Epítipo
CM5	Anti-hFcγ	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	TAG34	A
CM5	Anti-hFcγ	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.001	A
CM5	Anti-hFcγ	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.005	B
CM5	Anti-hFcγ	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.010	B
CM5	Anti-hFcγ	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.019	A/B
CM5	Anti-hFcγ	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.029	B
CM5	Anti-hFcγ	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.033	A
CM5	Anti-hFcγ	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.080	A

20 El epítipo de OX40L reconocido por el TAG34 fue definido como epítipo A. Sin embargo TAG34 no se une al OX40L desnaturalizado (en una inmunoelectrotransferencia (Western Blot)) en una concentración de anticuerpos de 100ng. Los anticuerpos dentro de un grupo de epítipo (A o B) exhiben actividad inhibitoria cruzada, mientras que los anticuerpos provenientes de grupos
25 diferentes exhibieron señales de unión aditiva. El LC.019 neutraliza otros anticuerpos del grupo A al igual que del grupo B.

147

Ejemplo 10

Especificidad de unión del TAG34, LC.001 y LC.005 a CD40L y TNF α

Instrumento: Biacore 3000, solución amortiguadora de corrida y de reacción: HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.005%, ph 7.4), 25°C. La inyección de analito fue llevada a cabo por tres minutos a 100 nM y 500 nM y lavada con HBS-P por dos minutos. La regeneración de la superficie fue llevada a cabo por medio de dos inyecciones de HCl 100 mM por 1 minuto cada una. El chip, el formato y la secuencia del ensayo de las inyecciones y los datos cinéticos corresponden a la descripción en la siguiente tabla 5.

Tabla 5

Chip	Captura	Ligando	Analito
CM5	Anti-hFc γ	TAG34	TNF α
	Anti-mFc γ	LC.001	CD40L
		LC.005	OX40L
		Anti-TNF α	
		Anti-CD40L	

En estos ensayos, CD40L exhibió alguna unión no específica a todos los anticuerpos o a la superficie del chip, pero después de la sustracción de las señales de fondo este ensayo demostró, que no hubo unión no específica del TNF α y el CD40L (hasta 500 nM) a los anticuerpos TAG34, LC.001 y LC.005 inmovilizados.

Ejemplo 11

Análisis de afinidad de los anticuerpos LC.001-IgG1 y LC.001-IgG4x

Instrumento: Biacore 3000, solución amortiguadora de corrida y de reacción: HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.005%, ph 7.4), 25°C. La inyección de analito fue llevada a cabo a ocho concentraciones de 0.78 nM - 100 nM por tres minutos y lavadas con HBS-P por cinco minutos. La regeneración de la superficie fue llevada a cabo por medio de dos inyecciones de HCl 100 mM por 1 minuto cada una. El chip, el formato y la secuencia del ensayo de las inyecciones y los datos cinéticos corresponden a la descripción en la siguiente

150

tabla. Los datos cinéticos fueron calculados por medio de ajuste de los datos cinéticos a un modelo de unión de Langmuir 1:1.

Tabla 6

5

Chip	Captura	Ligando	Analito	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	K _D (M)
CM5	Anti-mFcγ	LC.001	hOX40L-His	4.27x10 ⁴	3.46x10 ⁻⁹	<2,3x10 ⁻¹¹
CM5	Anti-mFcγ	LC.001-IgG4x	hOX40L-His	4.85x10 ⁴	7.72x10 ⁻⁹	<2,06x10 ⁻¹¹

LC.001 y LC.001-IgG4x exhiben la misma afinidad hacia hOX40L-His.

Ejemplo 12

10 Ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos que se unen a OX40L

Las placas recubiertas con SA (placas de ELISA de base plana 96, Microcoat) fueron recubiertas con OX40L biotinilado de 0.5 µg/ml disuelto en solución amortiguadora de incubación (IB = PBS que contiene Tween 20 al 0.1% (Serva) y proteína de bloqueo al 1%) por 1 hora a temperatura ambiente. Luego las placas fueron lavadas dos veces empleando solución amortiguadora de lavado (WB = salina que contiene Tween 20 al 0.1%).

Las muestras (los sobrenadantes del cultivo celular o los anticuerpos purificados) fueron diluidas serialmente en IB y adicionadas a los pozos. Las placas fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas fueron lavadas dos veces empleando WB. Posteriormente un conjugado de un anticuerpo de cabra en contra del IgG humano y POD (Dianova) fue diluido a 50 ng/ml en IB y adicionado a los pozos. Las placas fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las placas fueron lavadas dos veces empleando WB y desarrolladas con solución ABTS® lista-para-usar (Roche) a temperatura ambiente (RT) en la oscuridad. La absorbancia fue medida a 405 nm después de que la absorbancia de la concentración más alta alcanzó una OD suficiente (Fig. 1a). Los valores de EC50 son obtenidos en el rango de 3 nM - 8 nM.

Ejemplo 13

107

Ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos que inhiben la interacción de OX40 humano / OX40L humano

Las placas recubiertas con SA (placa de ELISA 96 de base plana, Microcoat, Alemania) fueron recubiertas con OX40L biotinilado 0.5 µg/ml disuelto en IB por 1 hora a temperatura ambiente. Luego las placas fueron lavadas dos veces empleando WB (solución amortiguadora de PBS, 0.1%(p/v) Tween™ 20.

Las muestras fueron diluidas en IB a una concentración de 1 µg/ml y adicionados a los pozos en diluciones en serie. A fin de lograr la máxima unión de OX40 al OX40L en algún pozo, solo se adicionó IB. Luego a cada pozo se adicionó una solución de OX40 humano conjugado con Digoxigenina (Roche Diagnostics GmbH, DE) a una concentración de 0.2 µg/ml. Las placas fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas fueron lavadas dos veces empleando WB. POD-Oveja<Digoxigenina> (Roche) fue diluida a 50 mU/ml en IB y adicionada a los pozos. Las placas fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las placas fueron lavadas dos veces empleando WB y desarrolladas con solución ABTS® lista-para-usar (Roche) a temperatura ambiente (RT) en la oscuridad. La absorbancia fue medida a 405 nm después de 10 a 20 minutos (Fig. 1b). Los valores de IC50 fueron obtenidos en el rango entre 1 nM y 4 nM.

Ejemplo 14

Ensayo FACS para la detección de HuMabs que inhiben la interacción de OX40 humano con OX40L humano expresados en células K562 (células K562_OX40L).

Propósito: Ensayo para la determinación de la propiedad del hOX40L de HuMab para bloquear la interacción de la proteína de fusión hOX40:hFc etiquetada con Dig con la línea celular K562_hOX40L que expresa el hOX40L.

Procedimiento: El ensayo es llevado a cabo con hOX40:hFc etiquetada con Dig como "reactivo de ensayo" y el hOX40L del HuMab como "competidor".

Reactivo de ensayo: patrón 0.5 µg/µl - 1:10 diluido en PBS), 100 µl de anti digoxigenina - FLUOS. 1:25 diluido en PBS / 0.5% BSA / 1% reactivo de bloqueo (Roche Diagnostics GmbH, DE).

150

2x10⁵ células K562_OX40L (cultivadas en ISF-0) fueron lavadas en 2 ml de PBS y resuspendidas en 100 µl de PBS. Esto es seguido por la adición del competidor en PBS (relación competidor/reactivo de 0:1 / 1:1 / 1.5:1 / 2:1 / 2.5:2 / 5:1). Esto es
5 seguido por un tiempo de incubación de 30 minutos, RT y luz de día. Luego el reactivo (en PBS) fue adicionado; tiempo de incubación: 30 minutos, RT y luz de día. Las células fueron lavadas con 2 ml de PBS y convertidas en píldoras por centrifugación. El anticuerpo secundario para tinción (fluoresceína - anti-digoxigenina, Fragmentos de Fab (Roche, 1207741)) fue adicionado e incubado
10 por 30 minutos, 4°C en la oscuridad. Las células fueron lavadas con 2 ml de PBS y convertidas en píldoras por centrifugación. Después de eso las células fueron resuspendidas en 0.5 ml de PBS. La medida de las muestras fue llevada a cabo en un Escáner de FACS (Fig.2).

15 Ejemplo 15

Ensayo funcional para la determinación de la capacidad inhibitoria de los anticuerpos para la generación de señales hOX40/hOX40L ("Ensayo NFκB")

Las células HeLa del tipo natural (wt) y HeLa que expresan OX40 humano
20 (HeLa_OX40) fueron cultivadas en Medio Esencial Mínimo (MEM), 1x piruvato - Na, 1x Aminoácidos No Esenciales (Gibco), FCS al 10% y en el caso de las células recombinantes + 800 µg/ml de G418. K562 y K562 que expresa OX40L fueron cultivadas en medio ISF-O, y en el caso de células recombinantes se
adicionaron 200 µg/ml de G418.

25

Las células HeLa_wt o HeLa_OX40 fueron sembradas a una densidad celular de 3x10⁴ células / 100 µl en una placa de 96 pozos w/o G418 e incubadas durante la noche en un incubador de CO₂. Las células K562_wt o K562_OX40L fueron
adicionadas en una relación célula-a-célula de 1:1. Fijadas en Formalina o no
30 fijadas en Formalina, las células K562 que expresan OX40L (congeladas a -70°C) fueron descongeladas y diluidas 1:10 en MEM/FCS al 10%; las células K562_OX40L fueron preincubadas con anticuerpo en contra de OX40L por 30 min a RT. El tiempo de estimulación con las células K562_OX40L fue entre 30 y 150 min. La extracción de proteínas provenientes de los núcleos celulares tuvo lugar
35 de acuerdo con las instrucciones de los proveedores con el Kit - NE de Active Motif. El ELISA - NFκB TransAM de Active Motif (el ensayo fue llevado a cabo de

153

151

acuerdo con las instrucciones de los proveedores) fue empleado para determinar la generación de señales de OX40, la cual resultó en la activación NFκB. La medida fue llevada a cabo a una longitud de onda de absorción de 450/620 nm en un lector – MTP Tecan (Fig.3). Los valores de IC50 para todos los anticuerpos LC
5 fueron obtenidos en el rango entre 0.6 y 5 nM.

Ejemplo 16

10 Ensayo de activación de células T

Principio del Ensayo:

Las células mononucleares sanguíneas periféricas (PBL) humanas son activadas
15 con una concentración sub-óptima de la fitohemaglutinina (PHA) mitógeno de células T, y co-estimuladas con células K562 que sobreexpresan OX40L. Bajo las condiciones de ensayo, las células T incubadas 24 horas a 37°C producen IL-2. La citoquina es medida en el sobrenadante empleando un ensayo ELISA. Para determinar el efecto de bloqueo de un Mab, las células K562_OX40L son pre-
20 incubadas por 1 hora con diluciones apropiadas del anticuerpo antes de co-cultivarse con PBL.

Procedimiento:

25 Las células mononucleares sanguíneas periféricas (PBL) humanas son separadas a partir de sangre entera heparinizada por medio de centrifugación por gradiente de densidad en Histopaque®-1077 (Sigma). Después de lavar con Hanks, las células son contadas empleando la solución de Turk, y las células son resuspendidas a una concentración de 10^6 /ml en RPMI 1640 (Gibco),
30 complementadas con penicilina, estreptomicina y glutamina (Gibco 10378-016), y FBS al 10%. Las células K562 de control (tipo natural) son mantenidas en el mismo medio RPMI complementado como se describió. Las células K562 transfectadas con OX40L son mantenidas en el mismo medio complementado con Geneticina (G418, Gibco) a una concentración final de 50 mg/ml. Las células
35 K562 (ya sea WT u OX40L+) son diluidas con el mismo medio en 1.5×10^5 células/ml, y repartidas dentro de cada pozo de una placa de cultivo de tejidos de 96 pozos en 50 µl/pozo (0.75×10^4 /pozo). Diluciones apropiadas del Mab son

184

152

adicionadas a las células en un volumen de 20 μ l/pozo, e incubadas por 1 hr. a 37°C. Cada dilución es probada en pozos por duplicado. Las PBL son adicionadas a un volumen de 100 μ l/pozo (10^5 células/pozo). La proporción final de las PBL a las células K562 es ~13:1. PHA (10X) (Sigma L-9132) es adicionado a 20 μ l/pozo (concentración final 0.75 μ g/ml). El volumen total por pozo es completado a 200 μ l con RPMI /FCS al 10%. Las placas son incubadas a 37°C en un incubador humidificado con CO₂ al 5% por 24 horas. Después de la centrifugación de las placas, los sobrenadantes son recogidos y la IL-2 probada por medio de ELISA (BD, San Diego, CA, Cat No2627KI), de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Fig.4). Para calcular la IC₅₀ (Concentración de Mab que bloquea el 50% de la IL-2 liberada por las PBL estimuladas con OX40L), la concentración de fondo de IL-2 producida en los cultivos de control (PBL+PHA+K562WT) fue sustraída de la IL-2 total producida por las PBL estimuladas con células K562xOX40L+ (Fig. 5). IC₅₀ TAG34: 0.07 μ M; LC.001: 2 nM; LC.005: 10 nM. Los valores de IC₅₀ están en el rango entre 2 y 10 nM.

Ejemplo 17

Ensayo de tétanos ('Ensayo TT') Probando el efecto inhibitorio de los anticuerpos sobre linfocitos sanguíneos periféricos estimulados por el toxoide de tétanos

20

Las células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) fueron aisladas a partir de sangre heparinizada por medio de Ficoll Hypaque. En la mayoría de los casos, las PBMC recién aisladas fueron empleadas para este ensayo. En algunos casos, también se emplearon PBMC criopreservadas. El medio para este ensayo fue RPMI que contiene suero AB de macho humano al 10% (Sigma-Aldrich); Glutamina 2 mM y Pen/Estrep (mezcla lista para usar de antibiótico penicilina y estreptomycin (Roche Diagnostics GmbH DE); liofilizada reconstituida en 20 ml; se emplean 2ml por 1000ml de medio).

30 Para conseguir que se adhiriera al plástico, 300.000 PBMC por pozo fueron preincubadas durante la noche en placas de 96 pozos de fondo plano.

Al siguiente día, toxoide de tétanos (TT) (Chiron Behring) fue adicionado a los pozos en una concentración final de 2 a 5 μ g/ml. Los pozos de control positivo (proliferación/estimulación máximas) solo contenían TT, a todos los otros pozos se adicionaron los anticuerpos (como IgG purificados) en una concentración final de

700

10 $\mu\text{g/ml}$. El TAG-34 Mab Murino fue incluido en el ensayo (concentración final 10 $\mu\text{g/ml}$). El medio solo fue empleado como control de fondo no estimulante. Todos los ensayos fueron establecidos por triplicado.

- 5 Después de seis días de incubación adicional (37°C, CO₂ al 5%, humedad del 95%) se adicionó timidina-H³ en una concentración final de 1 $\mu\text{Curie/ml}$ (3.7×10^4 Bq/ml) y después de un período de incubación adicional de 16 horas, las placas fueron cosechadas y la timidina-H³ incorporada fue determinada en un contador beta (Fig.6).

10

Ejemplo 18

Reactividad cruzada de los anticuerpos de OX40L con OX40L de ratón

- 15 Para determinar la capacidad de los anticuerpos de la invención para la reacción cruzada con OX40L murino, el anticuerpo diluido en serie y los anticuerpos de control fueron incubados con células K562-mOX40L, que expresan de manera estable mOX40L. La unión a las células K562 WT y a las células K562-hOX40L, que expresan de manera estable hOX40L, también fue evaluada. Como control negativo se empleó un anticuerpo HuMab dirigido contra la hemocianina de la lapa californiana (alfa-KLH). El anticuerpo RM134L, anti-mOX40L de rata (eBioscience, San Diego, CA) fue incluido como control positivo para la expresión de mOX40L. El anticuerpo TAG-34, anti-hOX40L de ratón (MBL, Nagoya, Japón) fue incluido como control positivo for la expresión de hOX40L. Para la detección de anticuerpos humanos enlazados, se empleó un anticuerpo IgG anti humano de cabra conjugado con fluoresceína (FITC). Para la detección de RM134L enlazado, se empleó un anticuerpo IgG anti-rata de conejo biotinilado (DAKO, Glostrup, Dinamarca) en combinación con estreptavidina, conjugado con ficoeritrina (PE) (DAKO). Para la detección de TAG-34 enlazado, se empleó anticuerpo IgG anti-ratón de conejo conjugado con FITC. Los cálculos acerca de los valores EC50 o la unión máxima a 20 $\mu\text{g/ml}$ (Bmax) de los HuMabs probados fueron determinados empleando la regresión no lineal (respuesta sigmoidal a la dosis con pendiente variable) empleando el programa de computador Graphpad Prism.
- 25
- 30

Resultados:

35

154

El LC.001, de acuerdo con la invención, fue capaz de unirse al hOX40L como se indicó por un valor EC50 de $5.16 \pm 2.93 \mu\text{g/ml}$ y un valor de Bmax (MFI) de 385.22, pero no al mOX40L o a las células WT como se demostró por los valores de Bmax (MFI) de 11.41 y 9.67, respectivamente. Adicionalmente, el LC.001 (IgG4), de acuerdo con la invención, fue también capaz de unirse eficientemente al hOX40L como se indicó por un valor EC50 de $8.19 \pm 1.05 \mu\text{g/ml}$ y un valor Bmax (MFI) de 311.30, pero no al mOX40L o a las células WT como se demostró por un valor Bmax (MFI) de 13.47 y 9.58, respectivamente. Como se esperaba, el control negativo de alfa-KLH no se unió a ninguna célula. (Fig.7). Por lo tanto, los anticuerpos OX40L, de acuerdo con la invención, exhiben una unión al menos 30 veces menor al OX40L de ratón comparada con el OX40L humano.

Ejemplo 19

Potencial de los HuMabs de OX40L para activar el sistema del complemento

15

ELISA de unión de C1q y C3c

Para determinar la capacidad de los anticuerpos de la invención para inducir la unión al C1q y la activación del C3, una placa de ELISA fue recubierta con anticuerpo diluido en serie y anticuerpos de control. Como control negativo se empleó un IgG4 humano (The Binding Site, Birmingham, Inglaterra), que se une muy débilmente al C1q. El IgG1 humano (The Binding Site) y alfa-KLH (IgG1) fueron incluidos como controles positivos. Posteriormente, los anticuerpos recubiertos fueron incubados con C1q o suero humano reunido, como una fuente de C3. Para la detección del C1q enlazado, se empleó un anticuerpo de conejo dirigido contra C1q (DAKO) en combinación con un anticuerpo IgG anti-conejo de cerdo, conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (DAKO). Para la detección del C3c activado (generado via activación de C3), se empleó un anticuerpo C3c anti-humano de ratón (DAKO) en combinación con un anticuerpo IgG anti-ratón de conejo conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Para evaluar las diferencias en eficiencias de recubrimiento, los anticuerpos recubiertos fueron visualizados con un anticuerpo IgG anti-humano de cabra, conjugado con HRP. Los cálculos acerca de los valores EC50 o la unión máxima a $10 \mu\text{g/ml}$ (Bmax) de los HuMabs probados fueron determinados empleando la regresión no lineal (respuesta sigmoidal a la dosis con pendiente variable) empleando el programa de computador Graphpad Prism.

157

Resultados:

El LC.001, de acuerdo con la invención, fue capaz de unirse eficientemente al C1q como se indicó por un valor EC50 de 2.19 ± 0.42 $\mu\text{g/ml}$ y un valor de Bmax (OD405) de 3.089. Adicionalmente, tanto el control positivo IgG1 humano como el anti-KLH pudieron unirse eficientemente al C1q, como se indicó por valores EC50 de 4.17 ± 1.08 $\mu\text{g/ml}$ y 2.57 ± 1.51 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente y valores Bmax (OD405) de 2.685 y 3.306, respectivamente. Como se esperaba, el control negativo IgG4 humano no se unió al C1q, como se demostró por un valor Bmax OD405 de 0.353. Además, LC.001IgG4x, de acuerdo con la invención, había perdido la capacidad de unirse a C1q, como se demostró por un valor Bmax OD405 de 0.357.

En línea con las capacidades de unión del C1q, la deposición de C3c por LC.001 ocurrió en un forma dependiente de la concentración del anticuerpo, con un valor EC50 de 2.67 ± 0.16 $\mu\text{g/ml}$ y un valor de Bmax (OD405) de 2.614. Además, tanto los controles positivos IgG1 humano como anti-KLH pudieron depositar eficientemente el C3c, como se indica por los valores EC50 de 5.45 ± 0.36 $\mu\text{g/ml}$ y 2.16 ± 0.26 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, y los valores de Bmax (OD405) de 2.543 y 2.633, respectivamente. Como se esperaba, el control negativo IgG4 humano no depositó C3c, como se demuestra por un valor Bmax OD405 de 0.095. Además, el LC.001IgG4x, de acuerdo con la invención, había perdido su capacidad de depositar C3c, como se demostró por un valor Bmax OD405 de 0.090. (Fig.8 y 9).

25

Ejemplo 20

Potencial de HuMabs de OX40L para unirse a los receptores Fc γ s I, IIa y IIb

La citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) inducida por IgG es mediada por el receptor Fc γ s (Fc γ R) sobre células efectoras. Para determinar la capacidad de los anticuerpos de la invención para unirse a los Fc γ Rs, las células IIA1.6 (derivadas por dilución limitada de las células IIA1; Jones, B., y otros, J. Immunol. 136 (1986) 348-356) establemente transfectadas con Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb humanos y células tipo natural fueron incubadas con el anticuerpo diluido en serie y los anticuerpos de control. Como controles negativos, se emplearon IgG2 humano (The Binding Site Ltd., Reino Unido), que no se une al Fc γ RI, y IgG4

humano (The Binding Site), que no se une al FcγRII. El IgG1 humano (The Binding Site) fue incluido como control positivo para la unión de FcγRI y el IgG3 humano (The Binding Site) para la unión de FcγRII. Los anticuerpos enlazados fueron detectados por medio del análisis FACS empleando un anticuerpo dirigido contra el IgG humano conjugado con ficoeritrina (PE). Los calculos acerca de los valores EC50 o la unión máxima a 10 µg/ml (Bmax) del HuMab probado fueron determinados empleando el ajuste de curva por regresión lineal (pendiente variable) empleando el programa de computador Graphpad Prism.

El LC.001 fue capaz de unirse eficientemente al FcγRI (comparable al anticuerpo de control IgG1) como se indica por un valor EC50 de 0.11 ± 0.03 µg/ml y un valor Bmax (MFI) de 8041.54, pero no a FcγRIIa y FcγRIIb como se demostró por los valores Bmax (MFI) de 25,06 y 21,18, respectivamente.

El LC.001IgG4x fue menos eficiente en unirse al FcγRI comparado con LC.001 y era comparable con el anticuerpo de control IgG4, con un valor EC50 de 0.86 ± 0.12 µg/ml y un valor Bmax (MFI) de 6030.07. No se observó unión del LC.001 IgG4x al FcγRIIa y FcγRIIb (valores Bmax (MFI) de 21.40 y 19.27, respectivamente), mientras que el anticuerpo de control IgG3 fue capaz de unirse (valores Bmax (MFI) de 536.65 y 418.59, respectivamente) (Fig.10). El valor EC50 para la unión al FcγRI es, por lo tanto, para LC.001IgG4x ocho veces comparado con el valor EC50 del anticuerpo LC.001.

Ejemplo 21

Potencial de los HuMabs de OX40L para unirse a FcγRIIIa en células NK

Para determinar la capacidad de los anticuerpos de la invención para unirse al FcγRIIIa (CD16) en células Asesinas Naturales (NK), Células Mononucleares Sanguíneas Periféricas (PBMCs) fueron aisladas e incubadas con 20 µg/ml de anticuerpo de HuMab y anticuerpos control, en la presencia o ausencia de 20 µg/ml de un anticuerpo de ratón de bloqueo a FcγRIIIa (anti-CD16, clón 3G8, RDI, Flanders, NJ), para verificar la unión via FcγRIIIa. Como controles negativos, se emplearon IgG2 e IgG4 humanos (The Binding Site), que no se unen al FcγRIIIa. Los IgG1 e IgG3 humanos (The Binding Site) fueron incluidos como controles positivos para la unión a FcγRIIIa. Los anticuerpos enlazados en células NK fueron detectados por medio de análisis FACS empleando un anticuerpo CD56

(marcador de superficie de células NK) anti – humano de ratón etiquetado con PE (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) en combinación con un anticuerpo IgG (Fc) anti-humano F(ab)₂ de cabra etiquetado con FITC (Protos immunoresearch, Burlingame, CA). Se determinó la unión máxima a 20 µg/ml (Bmax) del HuMab probado.

El LC.001 fue capaz de unirse eficientemente al FcγRIIIa (comparable con el anticuerpo control IgG1) como se indicó por un valor Bmax (MFI) de 841.37. La adición de un anticuerpo de bloqueo contra FcγRIIIa suprimió la unión del LC.001 a las células NK (valor Bmax (MFI) de 194.61 comparado con una tinción de fondo de 145.38). El LC.001 IgG4x no se unió al FcγRIIIa y se comportó comparable al anticuerpo de control IgG4, con un valor Bmax (MFI) de 170.52, resultando en un Bmax de LC.001 IgG4x que es alrededor de solo el 10% de Bmax de LC.001. La adición de un anticuerpo de bloqueo contra FcγRIIIa no tuvo efecto sobre la unión de LC.001 IgG4x (valor Bmax (MFI) de 174.26) (Fig.11).

Ejemplo 22

Efecto de hMab_hOX40L y Mab TAG-34 que se unen a HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical primaria humana / PromoCell)

Se describió que las células endoteliales expresan hOX40L (Kotani, A., y otros, Immunol. Lett. 84 (2002) 1-7). Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) expresan de manera natural al hOX40L y por lo tanto, podrían ser empleadas como "modelo de células endoteliales". El propósito de este ensayo fue para determinar el destino del hOX40L en células HUVEC después de que se une a los anticuerpos TAG-34 y LC.001.

Las HUVEC fueron descongeladas y expandidas en medio ECG-M más FCS al 2% por 4 días, en frascos T175 (Sarstedt). Las células fueron colocadas en placas de 24 pozos (10.000 células/pozo).

Después de 3 días, el medio fue cambiado a ECG-M + FCS al 0.5 %. La adición del anticuerpo (<KLH> (anticuerpo en contra de la hemocianina de la lapa californiana), TAG-34 o LC.001 para la inducción de modulación descendente) a 10 µg/ml e incubación por 2,5 h o 24 h. Tinción de nuevo de las células HUVEC con TAG-34 o LC.001. Tinción de FACS con el anticuerpo secundario contra el

IgG murino, etiquetado con Alexa488 (= <m>) o en contra del IgG humano, etiquetado con Alexa488 (= <h>) cada uno con 10 µg/ml. La medida de FACS fue realizada en el escáner de FACS (Becton Dickinson) y se calculó la intensidad promedio de fluorescencia (MFI).

5

El anticuerpo <KLH> fue empleado como control negativo, no específico.

10

La Tabla 7 muestra que la adición de LC.001 no resulta en modulación descendente de la expresión de OX40L en células HUVEC ni después de 2,5 ni después de 24 h (comparar la línea 4 con las líneas 5 y 6). Sin embargo, la adición de TAG 34 muestra una fuerte modulación descendente (alrededor de 3 veces) de hOX40L en células HUVEC después de 2,5 horas al igual que después de 24 h (comparar la línea 10 con las líneas 11 y 12).

15

Los anticuerpos, de acuerdo con la invención, en una concentración de 10 µg/ml no inducen la regulación descendente de la expresión de OX40L en células HUVEC.

Tabla 7

20

Mab empleado para la modulación descendente	Mab empleado para la tinción	Mab secundario para el FACS	MFI	
			2.5 horas	24 horas
1. medio de control	-	<h>	5.17	5.39
2. medio de control	LC.001	<h>	28.52	24.99
3. <KLH>	-	<h>	4.76	4.74
4. <KLH>	LC.001	<h>	31.44	23.07
5. LC.001	-	<h>	36.52	30.78
6. LC.001	LC.001	<h>	38.58	38.69
7. Medio de control	-	<m>	3.68	3.18
8. Medio de control	TAG-34	<m>	31.81	25.32
9. <KLH>	-	<m>	3.68	3.43
10. <KLH>	TAG-34	<m>	30.79	31.58
11. TAG-34	-	<m>	9.44	7.39
12. TAG-34	TAG-34	<m>	8.97	14.89

164

Ejemplo 23

Análisis de inmunoelectrotransferencia (western blot) de TAG34, LC.001 y LC005

- 5 40 y 100 ng de hOx40L-His (R&D Systems, con un tamaño teórico de 28-34 kDa) y el marcador de peso molecular Magik Mark XP (Invitrogen; 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 220 kDa) fueron preparados para electroforesis en gel. Por lo tanto, x µl de Proteína, 2.5 µl de solución amortiguadora de la muestra NuPage LDS (sal de litio de dodecil sulfato) (4x), 1 µl de Agente Reductor de NuPage (10x), y H₂O
- 10 ad 10 µl fueron colocados juntos y desnaturalizado por 10 min. a 70°C. Después de eso, las muestras fueron cargadas sobre un gel NuPage (Novex; 10% Bis-Tris) y corridas por 1 h a 150V en Solución Amortiguadora de Comida 1x MOPS (Novex).
- 15 El gel fue transferido por medio de un Semi-Dry-Blot sobre una Membrana de PVDF (Millipore; activación de la membrana por 5 minutos de incubación en metanol y 10 minutos de incubación en solución amortiguadora de transferencia 1x) empleando la Solución Amortiguadora de Transferencia NuPage 1x (1x solución amortiguadora, antioxidante al 0.1%, metanol al 10%) por 1 h / 50 mA en
- 20 una cámara semi seca. La membrana fue bloqueada en 1x PBS / 5% leche / 0,5% Tween bajo agitación por 1h a RT. El anticuerpo primario (pAB) fue diluido en 1x PBS / 1% leche / 0.5 % Tween, adicionados e incubado durante la noche a 4°C.

- LC.001 : 1.9 µl (1.6 µg) en un volumen total de 4 ml
- 25 LC.005 : 1.1 µl (1.6 µg) / 4ml
- TAG34: 1.6 µl (1.6 µg) / 4ml

- La membrana fue lavada 3x por 10 minutos en 1xPBS/0.5%Tween. El anticuerpo secundario (sAB) fue diluido en 1x PBS / 1% leche / 0.5 % Tween, adicionados e
- 30 incubado por 1.5 h a RT. Para LC.001 y LC.005, el anticuerpo policlonal contra el IgG humano (Pierce) en una dilución 1:10000 fue empleado como sAB; para el TAG34, el anticuerpo policlonal contra el IgG de ratón IgG proveniente del kit de inmunoelectrotransferencia (western blotting) Lumi-Light (Roche) en una dilución 1:400 fue empleado como sAB. La membrana fue lavada 2x por 30 minutos con
- 35 1x PBS / 0.5 % Tween. Para la detección del kit de inmunoelectrotransferencia (western blotting) Lumi-Light (Roche), se emplearon las instrucciones de acuerdo

con el fabricante. Los resultados de la inmunoelctrotransferencia (western blotting) fueron mostrados en la Figura 12. El LC.001 es capaz de detectar (dodecil sulfato) el OX40L desnaturalizado mientras que LC.005 y TAG34 no se unen al OX40L desnaturalizado.

5

10



15

20



25

30

35

Lista de Referencias

- Akiba, H., y otros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251 (1998) 131-138
- Akiba, H., y otros, *J. Exp. Med.* 191 (2000) 375-380
- Angal, S., y otros, *Mol. Immunol.* 30 (1993) 105-108
- Aplin, J.D., y Wriston, J.C. Jr., *CRC Crit. Rev. Biochem.* 10 (1981) 259-306
- 5 Arestides, R.S., y otros, *Eur. J Immunol.* 32 (2002) 2874-2880
- Armour, K.L., y otros, *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2613-2624
- Ausubel, F., y otros, ed., *Current Protocols in Molecular Biology (Protocolos Actuales en Biología Molecular)*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)
- 10 Barnes, L.M., y otros, *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270
- Barnes, L.M., y otros, *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123
- Baum, P.R., y otros, *EMBO J.* 13 (1994) 3992-4001
- Blazar, B.R., y otros, *Blood* 101 (2003) 3741-3748
- Boerner, P., y otros, *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95
- 15 Bruggemann, M., y otros, *Year Immunol.* 7 (1993) 33-40
- Brunhouse, R., y Cebra, J.J., *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917
- Burgess, J.K., y otros, *J. Allergy Clin. Immunol.* 113 (2004) 683-689
- Burton, D.R., y otros, *Nature* 288 (1980) 338-344
- Burton, D.R., *Mol. Immunol.* 22 (1985) 161-206
- 20 Capel, P.J., y otros, *Immunomethods* 4 (1994) 25-34
- Carter, P., y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América* 89 (1992) 4285-4289
- Chen, J., y otros, *EMBO J.* 12 (1993) 821-830
- Chen, J., y otros, *Int. Immunol.* 5 (1993) 647-656
- 25 Choi, T.K., y otros, *Nat. Genet.* 4 (1993) 117-123
- Cole y otros, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (Anticuerpos Monoclonales y Terapia de Cáncer)*, Alan R. Liss, p. 77 (1985)
- de Haas, M., y otros, *J. Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-341
- Duncan, A.R., y Winter, G., *Nature* 332 (1988) 738-740
- 30 Durocher, Y., y otros, *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9
- Edelman, G.M., y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América* 63 (1969) 78-85
- Edge, A.S., y otros, *Anal. Biochem.* 118 (1981) 131-137
- EP 0 307 434
- 35 Fishwild, D.M., y otros, *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 845-851
- Geisse, S., y otros, *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282
- Gessner, J.E., y otros, *Ann. Hematol.* 76 (1998) 231-248

- Harding, F., y Lonberg, N., *Ann. N. Acad. Sci.* 764 (1995) 536-546
- Hezareh, M., y otros, *J. Virol.* 75 (2001) 12161-12168
- Higgins, L.M., y otros, *J. Immunol.* 162 (1999) 486-493
- Hoogenboom, H.R., y Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388
- 5 Hoshino, A., y otros, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 861-869
- Humphreys, I.R., y otros, *J. Exp. Med.* 198 (2003) 1237-1242
- Idusogie, E.E., y otros, *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184
- Imura, A., y otros, *Blood* 89 (1997) 2951-2958
- Imura, A., y otros, *J. Exp. Med.* 183 (1996) 2185-2195
- 10 Ishii, N., y otros, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 2372-2381
- Jakobovits, A., y otros, *Nature* 362 (1993) 255-258
- Jakobovits, A., y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América* 90 (1993) 2551-2555
- Jones, B., y otros, *J. Immunol.* 136 (1986) 348-356
- 15 Jones, P., y otros, *Nature* 321 (1986) 522-525
- Kabat, E.A., y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest (Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico)*, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)
- Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161
- 20 Kjaergaard, J., y otros, *J. Immunol.* 167 (2001) 6669-6677
- Kotani, A., y otros, *Immunol. Lett.* 84 (2002) 1-7
- Carril, P., *J. Exp. Med.* 191 (2000) 201-208
- Lonberg, N., y Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* 25 (1995) 65-93
- Lonberg, N., y otros, *Nature* 368 (1994) 856-859
- 25 Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology (Manual de Farmacología Experimental)* 113 (1994) 49-101
- Lukas, T.J., y otros, *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560
- Lund J., y otros *FASEB J.* 9 (1995) 115-119
- Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202
- 30 Mallett, S., y Barclay, A.N., *Immunol. Today* 12 (1991) 220-223
- Mallett, S., y otros, *EMBO J.* 9 (1990) 1063-1068
- Marks, J.D., y otros, *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597
- Matsumura, Y., y otros, *J. Immunol.* 163 (1999) 3007-3011
- Meissner, P., y otros, *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 197-203
- 35 Miura, S., y otros, *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 1313-1325
- Morgan, A., y otros, *Immunology* 86 (1995) 319-324

153

- Morrison, S.L., y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América* 81 (1984) 6851-6855
- Ndhlovu, L.C., y otros, *J. Immunol.* 167 (2001) 2991-2999
- Neuberger, M.S., *EMBO J.* 2 (1983) 1373-1378
- 5 Neuberger, M.S., y otros, *Nature* 314 (1985) 268-270
- Nohara, C., y otros, *J. Immunol.* 166 (2001) 2108-2115
- Norderhaug, L., y otros, *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87
- Ohshima, Y., y otros, *J. Immunol.* 159 (1997) 3838-3848
- Orlandi, R., y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América* 86 (1989)
- 10 3833-3837
- Picard, D., y Schaffner, W., *Nature* 307 (1984) 80-82
- Queen, C., y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América* 86 (1989)
- 10029-10033
- Ravetch, J.V., y Bolland, S., *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 275-290
- 15 Ravetch, J.V., y Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492
- Riechmann, L., y otros, *Nature* 332 (1988) 323-327
- Rogers, P.R., y otros, *Immunity* 15 (2001) 445-455
- Salek-Ardakani, S., y otros, *J. Exp. Med.* 198 (2003) 315-324
- Schlaeger, E.-J., y Christensen, K., *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83
- 20 Schlaeger, E.-J., *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199
- Shields, R.L., y otros, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604
- Sojahr, H.T., y BaM, O.P., *Arch. Biochem. Biophys.* 259 (1987) 52-57
- Stuber, E., y Strober, W., *J. Exp. Med.* 183 (1996) 979-989
- Stüber, E., y otros, *Gastroenterology* 115 (1998) 1205-1215
- 25 Sugamura, K., y otros, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 420-431
- Takahashi, Y., y otros, *J. Virol.* 75 (2001) 6748-6757
- Takasawa, N., y otros, *Jpn. J. Cancer Res.* 92 (2001) 377-382
- Tanaka, Y., y otros, *Int. J. Cancer* 36 (1985) 549-555
- Taylor, L., y Schwarz, H., *J. Immunol. Met.* 255 (2001) 67-72
- 30 Taylor, L., y otros, *Int. Immunol.* 6 (1994) 579-591
- Taylor, L., y otros, *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 6287-6295
- Tommesen, J.E., y otros, *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004
- Thotakura, N.R., y Bahl, O.P., *Meth. Enzymol.* 138 (1987) 350-359
- Tozawa, H., y otros, *Int. J. Cancer* 41 (1988) 231-238
- 35 Tsukada, N., y otros, *Blood* 95 (2000) 2434-2439
- Tuailon, N., y otros, *J. Immunol.* 152 (1994) 2912-2920

166

Tuailon, N., y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América 90 (1993)
3720-3724

US4,179,337

US4,301,144

5 US4,496,689

US4,640,835

US4,670,417

US4,791,192

US 5,202,238

10 US 5,204,244

US 5,545,806

US5,545,807



US5,589,825

US5,625,126

15 US5,633,425

US5,661,016

US5,770,429

US5,789,650

US5,814,318

20 US5,874,299

US5,877,397

van de Winkel, J.G., y Anderson, C.L., J. Leukoc. Biol. 49 (1991) 511-524

van Dijk, M.A., y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374



Vitetta, E.S., y otros, Science 238 (1987) 1098-1104

25 Ward, E.S., y Ghetie, V., Ter. Immunol. 2 (1995) 77-94

Weinberg, A.D., y otros, J. Immunol. 162 (1999) 1818-1826

Weinberg, A.D., y otros, Nature Medicine 2 (1996) 183-189

Weinberg, A.D., y otros, Semin. Immunol. 10 (1998) 471-480

Weinberg, A.D., Trends Immunol. 23 (2002) 102-109

30 Werner, R.G., y otros, Arzneimittelforschung 48 (1998) 870-880

WO 01/14424

WO 87/05330

WO 92/03918

WO 92/22645

35 WO 93/1227

WO 94/11026

WO 94/25585

WO 95/12673

WO 95/21915

WO 98/24884

WO 99/15200

5 Wu, T., y otros, Transplant. Proc. 33 (2001) 217-218

Yoshioka, T., y otros, Eur. J. Immunol. 30 (2000) 2815-2823

10



15

20



25

30

35

Reivindicaciones de la Patente

1. Un anticuerpo, caracterizado porque dicho anticuerpo se une al OX40L, contiene una parte Fc derivada de origen humano y no se une al factor C1q del complemento.
5
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo no se une a los receptores del Fcγ humano en células NK.
- 10 3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo humano.
- 15 4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.
5. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo se une al OX40L con un valor K_D de menos de 10^{-8} M.
- 20 6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el rango de K_D es entre 10^{-12} a 10^{-9} M.
- 25 7. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo de la subclase humana IgG1, que contiene una o más mutación(es) de PVA236, GLPSS331 y/o L234A/L235A (numerado de acuerdo con el Índice EU).
- 30 8. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo de la subclase humana IgG4.
9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque contiene la mutación S228P.
- 35 10. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, caracterizado porque contiene la mutación L235E.

kg

11. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque no activa el factor C3 del complemento.
- 5 12. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque este no induce la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).
- 10 13. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque este no induce la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC).
- 15 14. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque este muestra en un ensayo de ELISA inhibición al bloquear la interacción del OX40L inmovilizado con OX40 soluble a una concentración de recubrimiento de 0.5 µg/ml de OX40L con un valor IC50 en el rango de 1 nM - 4 nM.
- 20 15. Un anticuerpo, caracterizado porque dicho anticuerpo se une al OX40L y que el anticuerpo comprende una combinación de regiones variables seleccionada, de manera independiente, a partir del grupo que consista de las combinaciones
- 25 a) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 y el dominio variable de cadena pesada definido por SEQ ID NO:2;
- b) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 y el dominio variable de cadena pesada definido por SEQ ID NO:4;
- 30 c) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5 y el dominio variable de cadena pesada definido por SEQ ID NO:6;
- d) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7 y el dominio variable de cadena pesada definido por SEQ ID NO:8;
- 35 e) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9 y el dominio variable de cadena pesada definido por SEQ ID NO: 10;

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- f) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11 O 16 y el dominio variable de cadena pesada definido por SEQ ID NO:12
 - g) el dominio variable de cadena ligera (V_L) definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 y el dominio variable de cadena pesada (V_H) definido por SEQ ID NO:17;
 - h) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:18 y el dominio variable de cadena pesada definido por SEQ ID NO:19;
 - i) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 y el dominio variable de cadena pesada definido por SEQ ID NO:20.
16. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque la región variable de cadena ligera humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada, de manera independiente, a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 16 y 18.
 17. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque la región variable de la cadena pesada humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada, de manera independiente, a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 17, 19 y 20.
 18. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque el anticuerpo comprende el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 y el dominio variable de cadena pesada definido por SEQ ID NO:2, 17 o 20.
 19. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, caracterizado porque el anticuerpo comprende al menos una mutación de aminoácido en la parte Fc que causa la ausencia de unión al factor C1q del complemento.
 20. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, caracterizado porque el anticuerpo comprende una región constante de

171

cadena ligera kappa como se define por SEQ ID NO:13 o la región constante de cadena ligera de SEQ ID NO:61, 65 o 69.

- 5 21. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, caracterizado porque el anticuerpo comprende una región constante pesada como se define por SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15 o la región constante de cadena pesada de SEQ ID NO: 58.
- 10 22. Un anticuerpo que se une al OX40L, que comprende una cadena variable ligera y una cadena variable pesada, caracterizado porque la cadena variable pesada comprende CDR3 seleccionado a partir de SEQ ID NOs : 33-38 y/o la cadena variable ligera comprende CDR3 seleccionado a partir de SEQ ID NOs : 51-57.
- 15 23. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 22, caracterizado porque la cadena variable pesada comprende CDR1 seleccionado a partir de SEQ ID NOs: 21-25 y CDR2 seleccionado a partir de SEQ ID NOs: 26-32 y/o la cadena variable ligera comprende CDR1 seleccionado a partir de SEQ ID NOs: 39-44 y CDR2 seleccionado a partir de SEQ ID NOs: 45- 50.
- 20 24. Un anticuerpo, caracterizado porque este es producido por una línea celular seleccionada a partir del grupo que consiste de las líneas celulares hu-Mab<hOX40L>LC.001, hu-Mab<hOX40L>LC.005, hu-Mab<hOX40L>LC.010, hu-Mab<hOX40L>LC.019, hu-Mab<hOX40L>LC.029 y hu-Mab<hOX40L>LC.033.
- 25 25. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 caracterizado porque el anticuerpo es un Fab, F(ab')₂ o un fragmento de cadena sencilla.
- 30 26. Método para la producción de un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 25, caracterizado porque la secuencia de un primer ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo que se une al OX40L con un valor K_D de menos de 10⁻⁸ M es modificado de tal forma que dicho anticuerpo modificado no se une al factor C1q del complemento y/o el receptor del Fcγ humano en células NK, dicho primer ácido nucleico
- 35

170

5 modificado y un segundo ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo son insertados dentro de un vector de expresión, dicho vector es insertado en una célula anfitrión procariontica o eucariónica, dicha célula anfitrión es cultivada bajo condiciones que permiten la síntesis de dicho anticuerpo y dicho anticuerpo es recuperado a partir de dicho cultivo.

10 27. Método para la producción de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 26, caracterizado porque la secuencia de dicho primer ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo codifica la cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 22.

15 28. Una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25.

29. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 28.

20 30. Una célula anfitrión que comprende el vector de la reivindicación 29.

25 31. Un método para la preparación de una molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 que comprende cultivar la célula anfitrión de la reivindicación 30 bajo condiciones que permiten la síntesis de dicha molécula de anticuerpo y recuperar dicha molécula de anticuerpo a partir de dicho cultivo.

30 32. Una composición que comprende una molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 o una molécula de anticuerpo producida por el método de la reivindicación 28 o 27.

33. La composición de la reivindicación 32, la cual es una composición farmacéutica o una de diagnóstico.

35 34. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

175

35. Método para el tratamiento de un paciente con necesidad de terapia, caracterizado por administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.
- 5
36. El uso de un anticuerpo como se define en las reivindicaciones 1 a 23 para terapia.
37. El uso de un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 para la profilaxis y tratamiento de trastornos inflamatorios.
- 10
38. El uso de un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 para la preparación de un medicamento para la profilaxis y tratamiento de trastornos inflamatorios.
- 15
39. Kit que comprende una molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 28, un vector de la reivindicación 29 o una célula anfitrión de la reivindicación 30.
- 20
40. Método de modificar la secuencia inicial de aminoácidos de una CDR de cadena pesada de un anticuerpo precursor seleccionada a partir del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 21-38 y/o una CDR de cadena ligera de un anticuerpo precursor seleccionada a partir del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 39-57, caracterizado por proporcionar un ácido nucleico que codifica dicha secuencia inicial de aminoácidos, modificar dicho ácido nucleico en el que un aminoácido es modificado en la CDR1 de cadena pesada, 1-2 aminoácidos son modificados en la CDR2 de cadena pesada, 1-2 aminoácidos son modificados en la CDR3 de cadena pesada, 1-3 aminoácidos son modificados en la CDR1 de cadena ligera, 1-3 aminoácidos son modificados en la CDR2 de cadena ligera, y/o 1-3 aminoácidos son modificados en la CDR 3 de cadena ligera, expresar dicha secuencia de aminoácidos de la CDR modificada en una estructura de anticuerpo, medir si dicho anticuerpo se une al OX40L con un K_D de menos de 10^{-8} M y seleccionar dicha CDR modificada si el anticuerpo se une al OX40L con un K_D de menos de 10^{-8} M.
- 25
- 30
- 35

- 5
41. Un anticuerpo, caracterizado porque dicho anticuerpo se une al OX40L, siendo de la clase IgG1 humana y comprende como la cadena pesada y SEQ ID NO: 58, 62 o 66.
42. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 41, que comprende como
- 10 a) cadena pesada y SEQ ID NO:58 y como cadena ligera kappa la SEQ ID NO:61,
- b) cadena pesada y SEQ ID NO:62 y como cadena ligera kappa la SEQ ID NO:65
- o
- c) cadena pesada y SEQ ID NO:66 y como cadena ligera kappa la SEQ ID NO:69.
- 15
43. Un anticuerpo, caracterizado porque dicho anticuerpo se une al OX40L, siendo de la clase IgG1 que contiene la mutación L234A/L235A y comprende como la cadena pesada y SEQ ID NO: 59, 63 o 67.
- 20 44. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 43, que comprende como
- a) cadena pesada y SEQ ID NO:59 y como cadena ligera kappa la SEQ ID NO:61,
- 25 b) cadena pesada y SEQ ID NO:63 y como cadena ligera kappa la SEQ ID NO:65
- o
- c) cadena pesada y SEQ ID NO:67 y como cadena ligera kappa la SEQ ID NO:69.
- 30 45. Un anticuerpo, caracterizado porque dicho anticuerpo se une al OX40L, siendo de la clase IgG4 que contiene la mutación S228P comprende como la cadena pesada y SEQ ID NO: 60, 64 o 68.
- 35 46. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 45, que comprende como
- a) cadena pesada y SEQ ID NO:60 y como cadena ligera kappa la SEQ ID NO:61,

172

- b) cadena pesada y SEQ ID NO:64 y como cadena ligera kappa la SEQ ID NO:65 o
- c) cadena pesada y SEQ ID NO:68 y como cadena ligera kappa la SEQ ID NO:69.

5

10



15

20



25

30

35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> ANTICUERPOS ANTI-OX40L

<130> 22672 WO

<150> EP 04022158

<151> 2004-09-17

<150> EP 04030546

<151> 2004-12-23

<160> 69

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena ligera, región variable de LC.001, LC.059 y LC.063

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

175

- 2 -

<210> 2
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena pesada, región variable de LC.001

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena ligera, región variable de LC.005

<400> 3

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

178

176

- 3 -

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 4
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena pesada, región variable de LC.005

<400> 4

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

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

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

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

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

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

176

177

- 4 -

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena ligera. región variable de LC.010

<400> 5

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 6
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena pesada, región variable de LC.010

130

178

- 5 -

<400> 6

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

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

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

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly His Asp Lys Tyr Tyr Ala Tyr Tyr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
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 Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena ligera, región variable de LC.029

<400> 7

Met Leu His Pro Leu Cys Lys Val Gly Ser His Gln Gly Ser Val Ala
1 5 10 15

Val Asp Leu Gly Gln Ile Ser Leu Ser Pro Ser Ala Ala Cys Ser Leu
20 25 30

121

179

- 6 -

Lys Ile Leu Gln Leu Ile Thr Val Asn Ser Ile Ile Val Ser Leu Thr
35 40 45

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
50 55

<210> 8
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena pesada, región variable de LC.029

<400> 8

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
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 Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 57
<212> PRT
<213> Artificial

182

180

- 7 -

<220>

<223> cadena ligera, región variable de LC.019

<400> 9

Met Pro Pro Val Trp Lys Val Gly Ser His Gln Gly Ser Ala Ala Val
 1 5 10 15

Asp Leu Gly Gln Ile Ser Leu Ser Pro Ser Ala Ala Cys Ser Leu Lys
 20 25 30

Ile Leu Gln Leu Ile Thr Val Asn Ser Leu Ile Val Thr Leu Thr Phe
 35 40 45

Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 50 55

<210> 10

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada, región variable de LC.019

<400> 10

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

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

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

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

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

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

183

- 8 -

Ala Arg Lys Asn Trp Ser Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 11
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena ligera, región variable de LC.033 (a)

<400> 11

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 Gln Gly Val Ser Arg Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 12
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena pesada, región variable de LC.033

<400> 12

184

182

- 9 -

Gln Lys Gln Leu Val Glu Phe Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Arg Met Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena ligera, región constante

<400> 13

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

182

183

- 10 -

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 14
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena pesada, región constante (gamma 1)

<400> 14

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

186

184

- 11 -

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 15
<211> 327
<212> PRT
<213> Artificial

187

125

- 12 -

<220>

<223> cadena pesada, región constante (gamma 4)

<400> 15

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

126

186

- 13 -

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 16
<211> 104
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena ligera, región variable de LC.033 (b)

<400> 16

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 Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

189

137

- 14 -

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100

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

<220>
<223> cadena pesada, región variable de LC.059

<400> 17

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Asp Ile Pro Ala Ala Gly Thr Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

190

108

- 15 -

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena ligera, región variable de f LC.060

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

<210> 19
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena pesada, región variable de LC.060

<400> 19

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

101

189

- 16 -

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Ile Leu Val Thr Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena pasada, región variable de LC.063

<400> 20

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

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

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

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

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

192

- 17 -

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

Ala Lys Asp Asp Ile Pro Ala Ala Gly Thr Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 21

Ser Tyr Thr Met His
1 5

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 22

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 23

Asn Phe Gly Met His
1 5

- 18 -

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220> -
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 24

Asn Tyr Gly Met His
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 25

Ser Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 26

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

Gly

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 27

194

192

- 19 -

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

Gly

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 28

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

Gly

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 29

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

Gly

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 30

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

195

- 20 -

Gly

<210> 31
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 31

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

Gly Arg

<210> 32
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 32

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

Gly Arg

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 33

Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

191

194

- 21 -

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 34

Asp Arg Leu Val Ala Pro Gly Thr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 35

Lys Asn Trp Ser Phe Asp Phe
1 5

<210> 36
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 36

Asp Arg Met Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 37
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 37

Lys Asp Asp Ile Pro Ala Ala Gly Thr Phe Asp Pro
1 5 10

192

- 22 -

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 38

Lys Asp Ile Leu Val Thr Gly Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 39

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

<210> 40
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 40

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

<210> 41
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 41

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

195

196

- 23 -

<210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / . fragmento de anticuerpo

<400> 42

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

<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 43

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

<210> 44
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 44

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
1 5 10 15

Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
20

<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 45

199

- 24 -

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 46

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 47

Met Pro Pro Val Trp Lys Val
1 5

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 48

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 49

- 25 -

Leu His Pro Leu Cys Lys Val
1 5

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 50

Asp Val Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 51

Asn Ser Leu Ile Val Thr Leu Thr
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 52

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 53

- 26 -

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe Thr
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 54

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Gln Tyr Thr
1 5

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 55

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Thr
1 5

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 56

Asn Ser Ile Ile Val Ser Leu Thr
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

780

- 27 -

<400> 57

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Trp Thr Phe
1 5

<210> 58

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada de LC.001 (tipo IgG1 humana)

<400> 58

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

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

243

201

- 28 -

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

244

202

- 29 -

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 59
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena pesada de LC.001 (mutante IgG1 humano L234A, L235A)

<400> 59

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

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

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

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

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

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

202

293

- 30 -

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

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

246

- 31 -

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 60
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena pesada de LC.001 (mutante IgG4 humano S228P)

<400> 60

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

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

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

202

- 32 -

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

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

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

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

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

2/28

206

- 33 -

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 61
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena ligera de LC.001

<400> 61

209

297

- 34 -

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

240



- 35 -

<210> 62
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena pasada de LC.005 (tipo IgG1 humana)

<400> 62

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
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 Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

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

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

209

- 36 -

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

212

210

- 37 -

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

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

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

Gly Lys
 450

<210> 63
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena pesada de LC.005 (mutante IgG1 humano L234A, L235A)

<400> 63

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 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 Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

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

213

- 38 -

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

211

212

- 39 -

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 64
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena pesada de LC.005 (mutante IgG4 humano S228P)
<400> 64

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

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

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

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

215

213

- 40 -

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
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 Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

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

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

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

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

1/10

214

- 41 -

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 65
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena ligera de LC.005

<400> 65

214

215

- 42 -

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

218.

216

- 43 -

<210> 66
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena pesada de LC.060 (tipo IgG1 humana)

<400> 66

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Ile Leu Val Thr Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

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

219

217

- 44 -

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

220

218

- 45 -

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

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

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

Lys

<210> 67
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena pesada LC.060 (mutante IgG1 humano L234A, L235A)

<400> 67

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Ile Leu Val Thr Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

221

- 46 -

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

220

- 47 -

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 68
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena pesada de LC.060 (mutante IgG4 humano S228P)

<400> 68

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

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

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

223

221

- 48 -

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

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

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

Ala Lys Asp Ile Leu Val Thr Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

224

222

- 49 -

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

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

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

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

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

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

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 69
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena ligera de LC.060

<400> 69

228

- 50 -

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

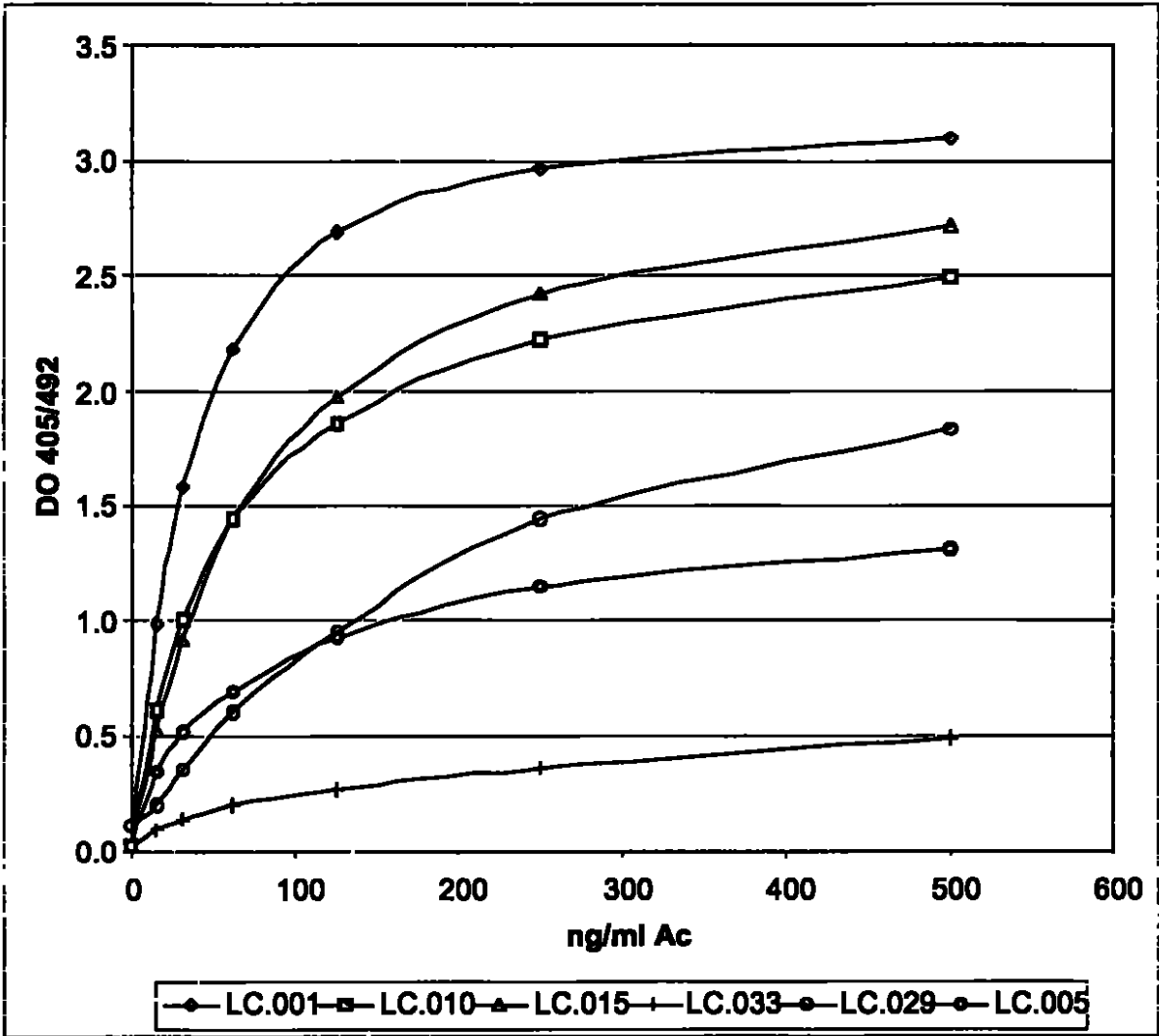
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

224

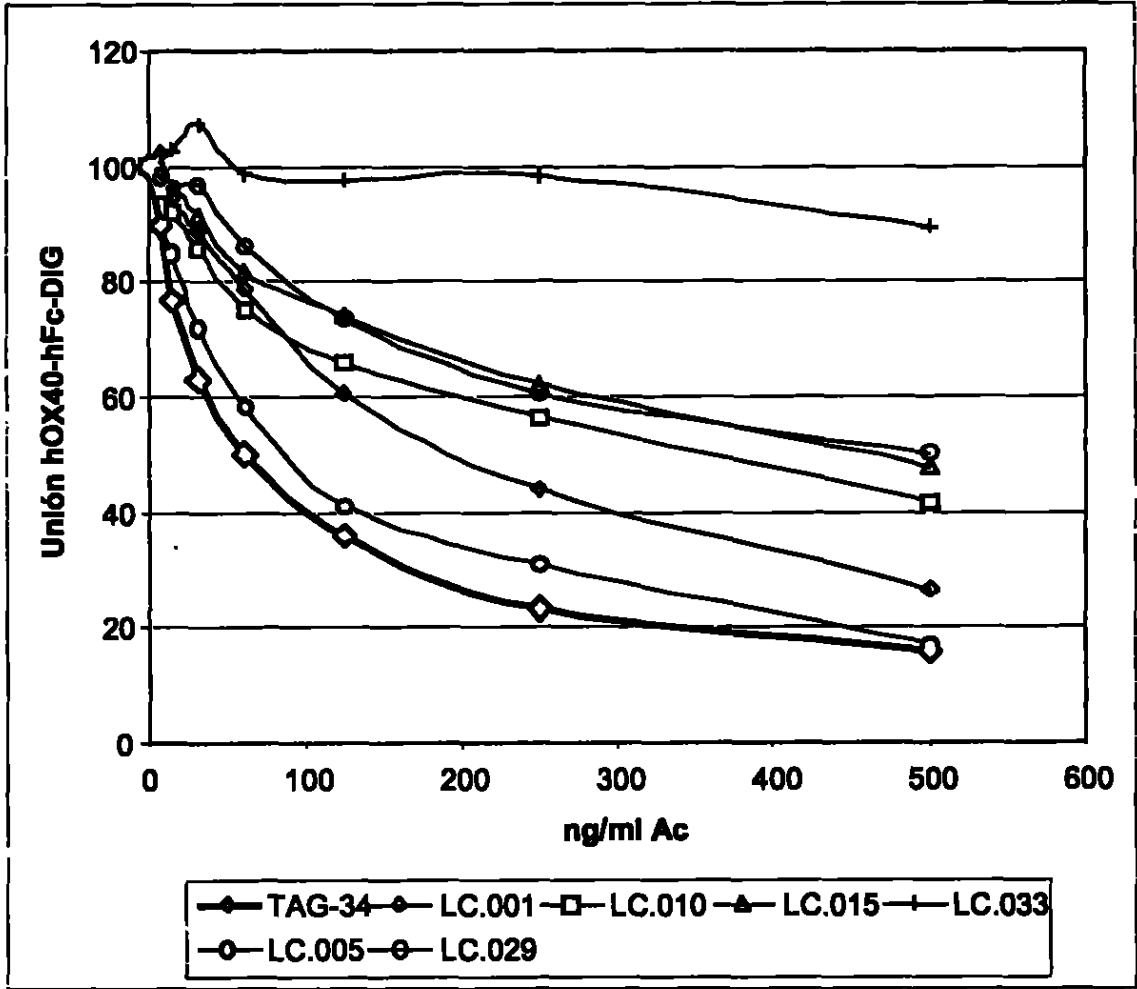
Fig. 1a



223

225

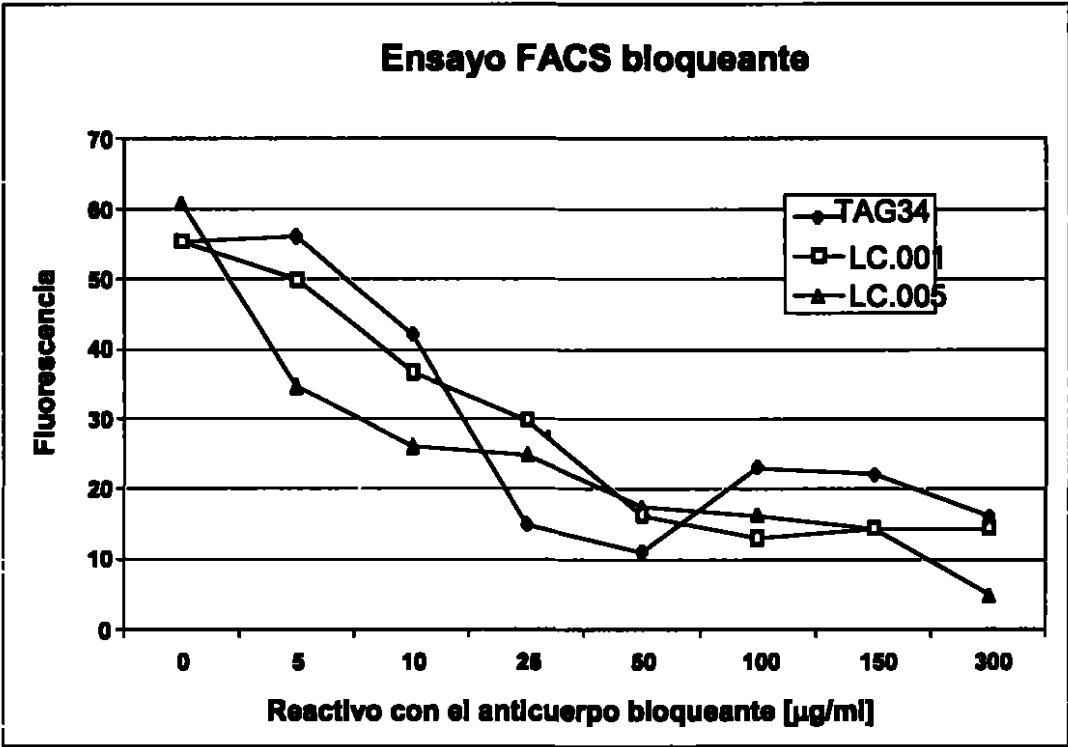
Fig. 1b



226

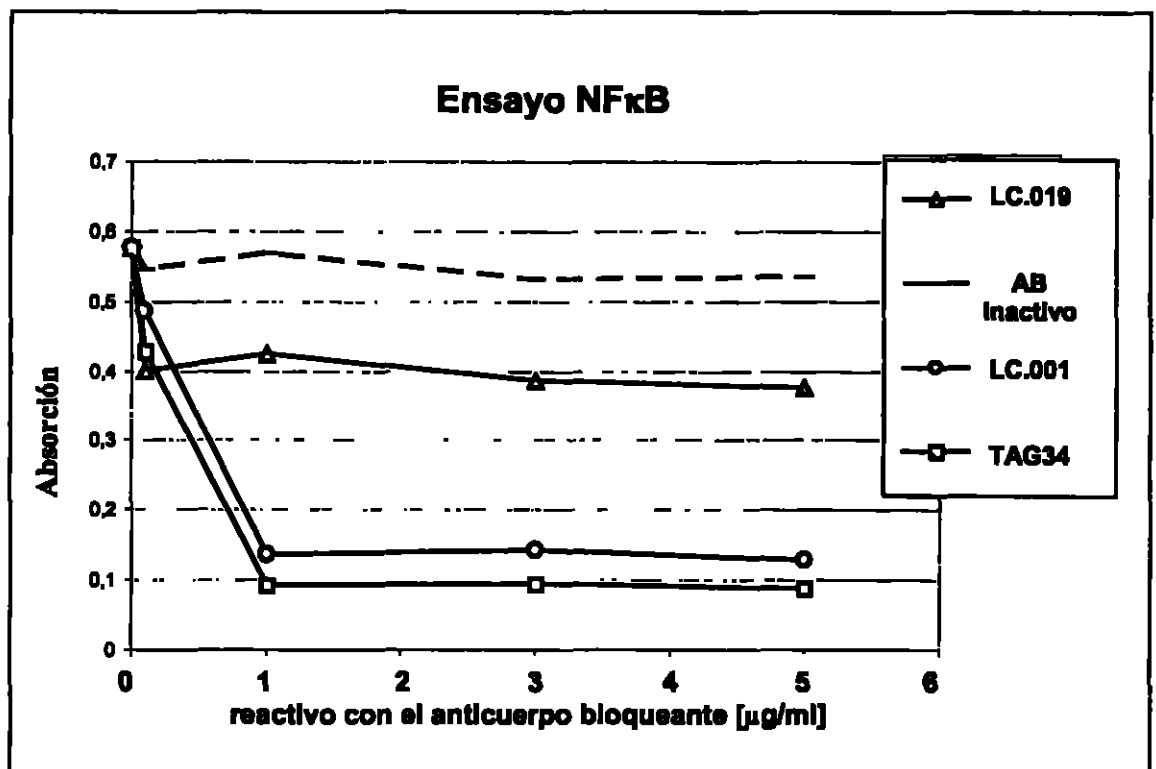
226

Fig. 2



227

Fig. 3



76

228

Fig. 4

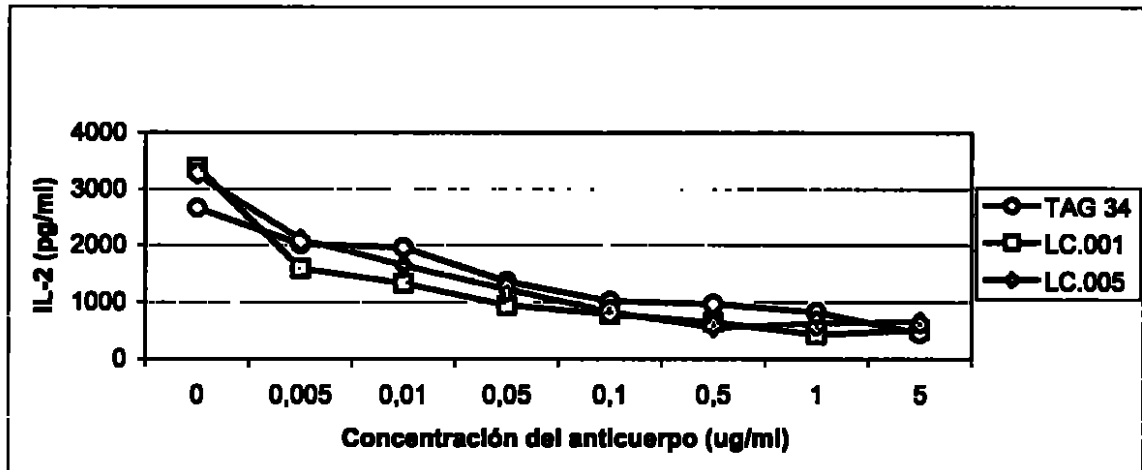
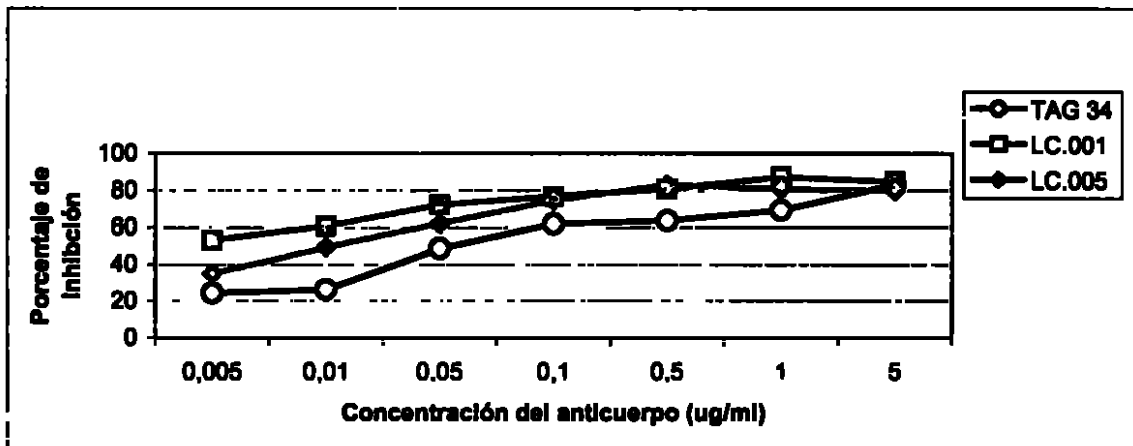


Fig. 5



234

Fig. 6

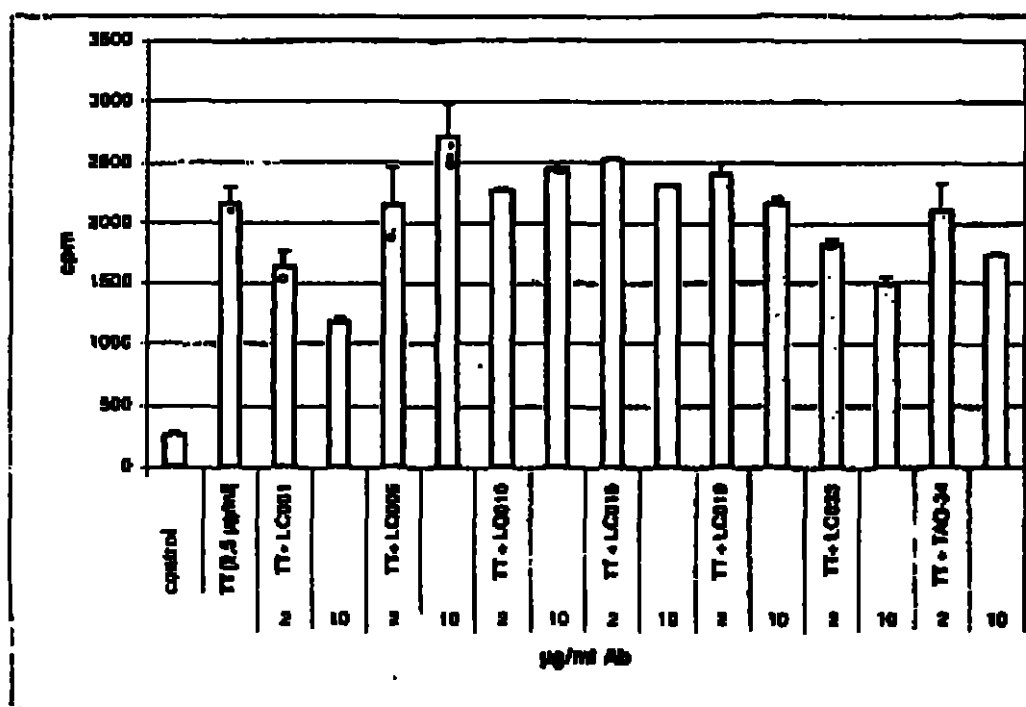
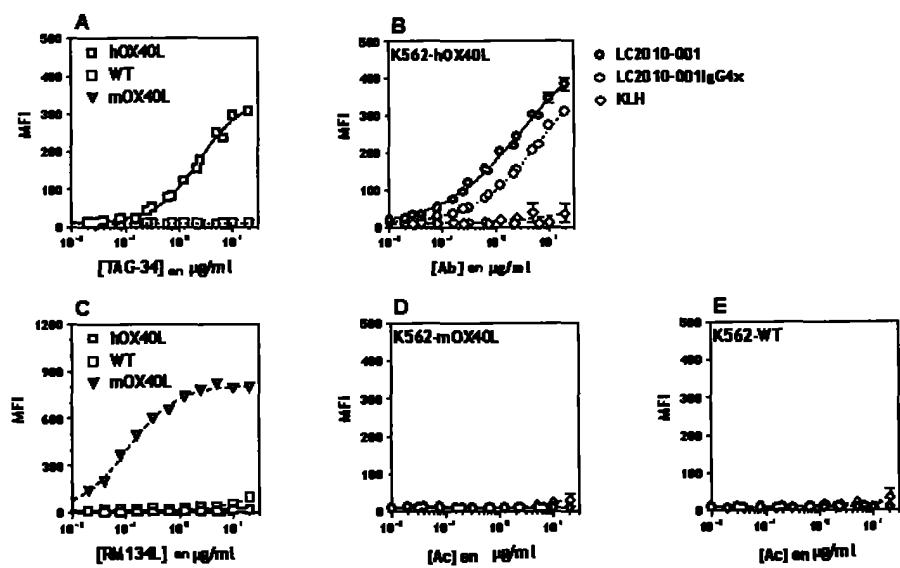


Fig. 7



7/11

283

231

Fig. 8

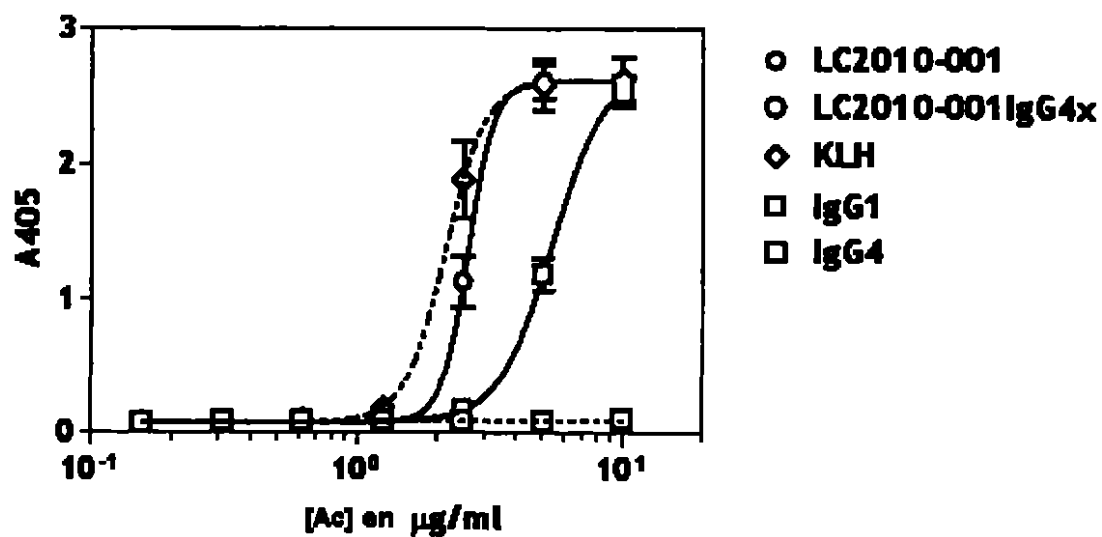
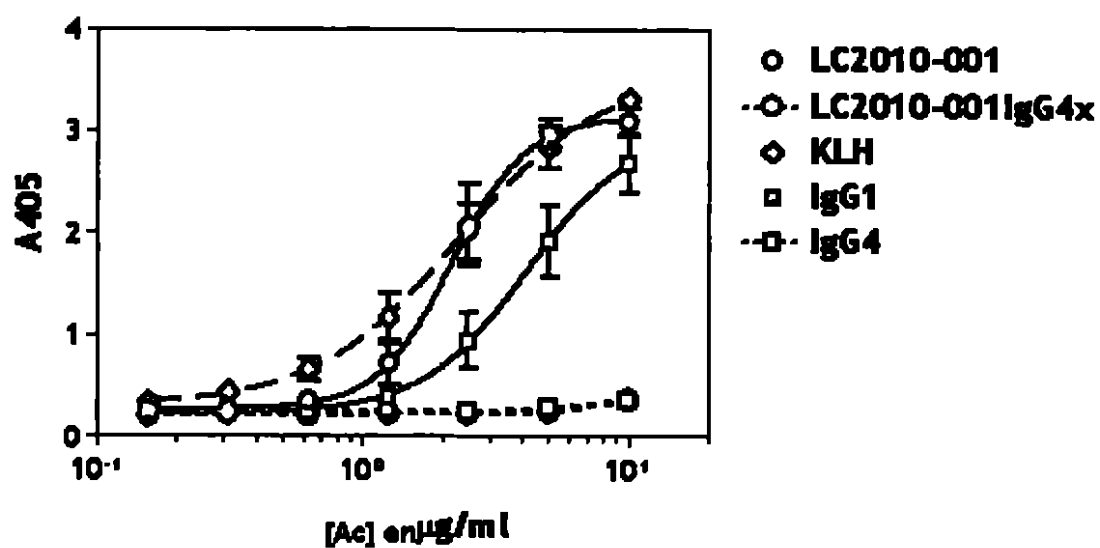
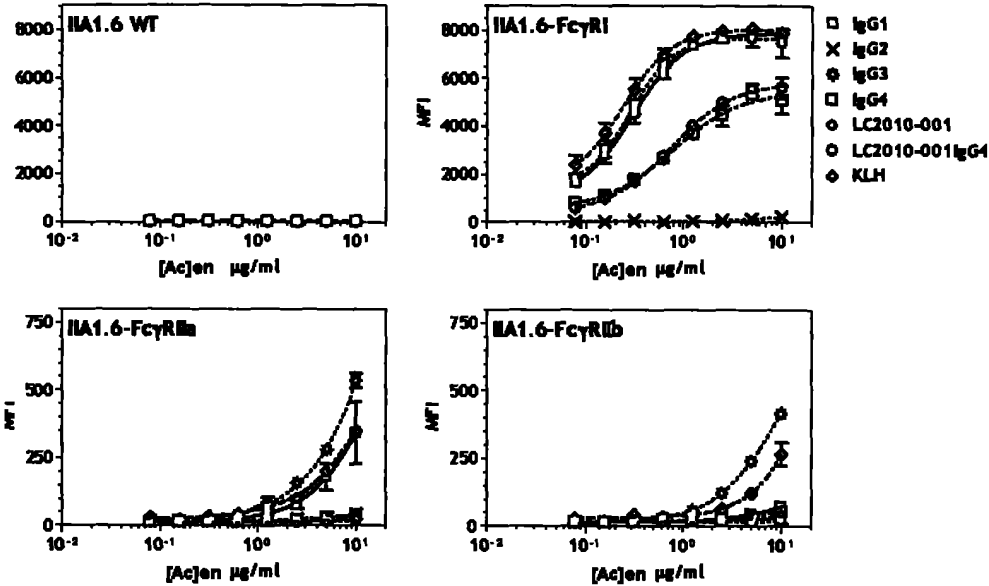


Fig. 9

234

Fig. 10

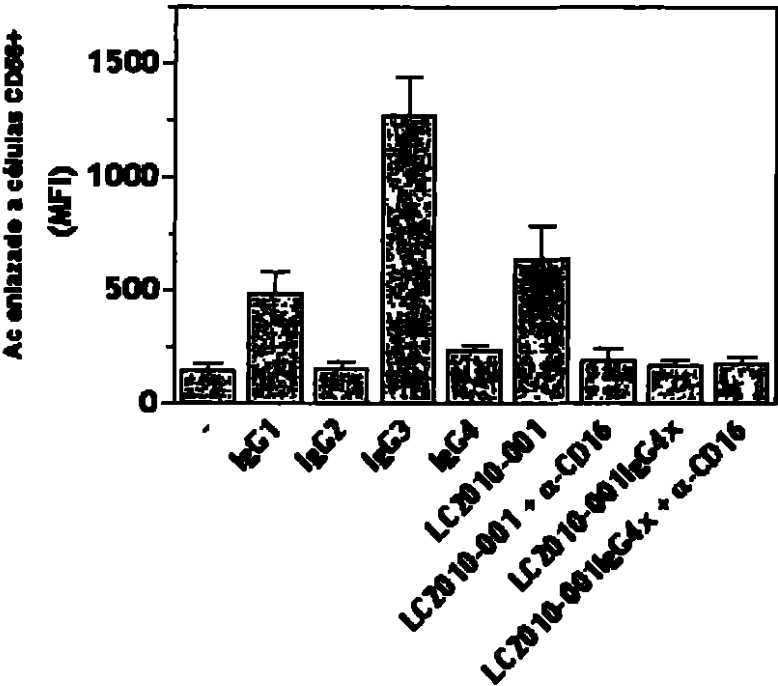
9/16



9/16

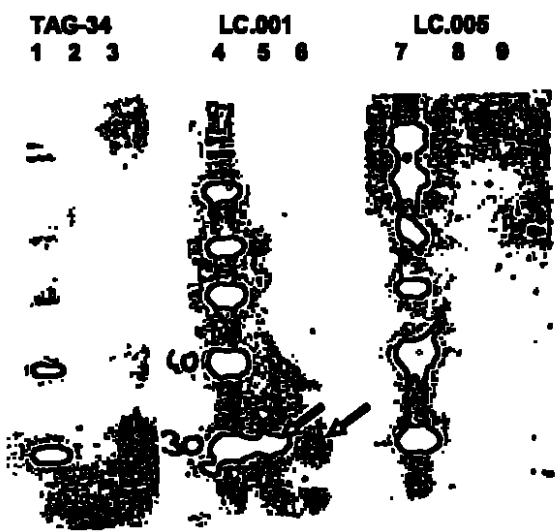
233

Fig. 11



234

Fig. 12



232

25

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 022/07 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 22 de marzo de 2007 por el Sr. Gabriel Ricaurte Echeverri, c. c. 25965 de Bogotá, Traductor Oficial según resolución No. 3987 de agosto 17 de 1981 expedida por el Ministerio de Justicia.

==

Caso 22672

Colombia

Declaración

El suscrito Notario público de Basilea/ Suiza, por el presente acto declara que la copia del traspaso autorizado es una copia fiel del documento original que fue presentado ante mí por

F. Hoffmann-La Roche AG

de Basilea/ Suiza,

Basilea/ Suiza, este 14-03-2007 (marzo catorce de dos mil siete)

(Fdo) Firma ilegible _____

A continuación aparece unido al documento antes descrito un sello que lleva una leyenda en idioma Suizo. El cual va unido al documento por un cordón.

Sello de caucho con la siguiente inscripción:

Dr. Peter Kuster
Abogado y Notario
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basilea

Apostilla

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Suiza

Este documento público

2. ha sido firmado por nombre ilegible

GABRIEL RICAURTE ECHEVERRI
TRADUCTOR OFICIAL
RES. 3987 Ministerio de Justicia
de agosto 17 de 1981

Page 1 of 6

238

226

3. En su función de *ilegible*
4. Y certificado por el sello de *ilegible*

Certificado

5. En Basilea
6. A los 15 días de marzo de 2007
7. Por la cancillería del estado del Cantón de Basilea-Stadt
8. No. 2'873/4'564
9. Sello/Estampilla:
10. Firma

Sello de caucho de la Cancillería del
Estado del Cantón de Basilea con
escudo en el centro.

(Fdo.) Ilegiblemente
Heidi Fischer

== ==

Caso 22672

Traspaso

YO/NOSOTROS, el(los) suscrito(s)

Josef Endl, biólogo, ciudadano Alemán
Ulmenstrasse 12, D-82362 Weilhim, Alemania

Elsie M. Eugui, investigadora científica, ciudadana Argentina
2513 Hasting Dr, Belmont, California 94002, USA

María Elena Fuentes, bióloga, ciudadana de los EUA
1413 South Mary Ave, Sunnyvale, California 94087, EUA

Yvo Graus, científico, ciudadano Holandés
Werdorperwaard 3, NL-3984 PR Odijk, Holanda

Aran Frank Labrijn, científico, ciudadano Holandés
2e Jan van der Heijdenstraat 66-3R, NL-1074 XW Amsterdam, Holanda


GABRIEL RICAURTE ECHEVERRI
TRADUCTOR OFICIAL
RES. 3987 Ministerio de Justicia
de agosto 17 de 1981

Page 2 of 6

239

MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES

835885
Gabriel Piedra
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

2001 MAR 23 A 11 18
[Signature]
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D C

①

①

237

Martín Lanzendoerfer, biólogo, ciudadano Holandés
Hofmairstrasse 25ª, D-82327 Tutzing, Alemania

Paul Parren, científico, ciudadano Holandés
Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk, Holanda

Frank Rebers, científico, ciudadano Holandés
Adriaan Menninckkwartier 34, NL-3554 CT Utrecht, Holanda

Ralf Schumacher, biólogo, ciudadano Alemán
Hochfeldstrasse 78, D-82377 Penzberg, Alemania

Stefan Seeber, biólogo, ciudadano Alemán
Sealanger 34, D-82377 Penzberg, Alemania

Jan van de Winkel, científico, ciudadano Holandés
Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist, Holanda

Martine van Vugt, científica, ciudadana Holandesa
Fluweelmos 6, NL-3994 KR Houten, Holanda

CEDENTES. Por el presente acto declaramos que somos los inventores conjuntos de la invención titulada:

Anticuerpos Anti-OX40L

Para la cual la primera solicitud se presentó como sigue:

<u>País</u>	<u>Fecha de presentación</u>	<u>No. de Serie</u>
22672 EP	17.09.2004	04022158.2
22672 EP1	23.12.2004	04030546.8

y para buena y valiosa consideración, el recibo suficiente por el presente acto se reconoce, nosotros hemos vendido, traspasado y cedido todos los derechos y el

GABRIEL RICARDO DE JESUS
F. TRADUCTOR
RES. 3967 Mins. de Justicia
de agosto 17 de 1981

246

728
título para y de la mencionada invención y de la mencionada solicitud en todos los países del mundo al CESIONARIO:

F. Hoffmann-La Roche AG

Grenzacherstrasse 124,

CH-4070 Basilea (Suiza)

Requiere legalización

El presente traspaso es para, pero no se limita a los siguientes países:

Argentina, Australia, Austria, Bélgica, Brasil, Canadá, Chile, Colombia, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda, Israel, Italia, Japón, Kazakhstan, Corea, Luxemburgo, México, Mónaco, Países Bajos, Nueva Zelanda, Noruega, Pakistán, República Popular de China, Filipinas, Polonia, Portugal, Rusia, Arabia Saudita, Sudáfrica, España, Suecia, Suiza, Taiwán, Turquía, Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte, Islandia, Ucrania, Uruguay, E.U.A. y Venezuela.

Por virtud de este traspaso el mencionado CESIONARIO está totalmente facultado para solicitar y obtener en su propio nombre y en cualquier otro nombre en y para su propia cuenta y propósito PRIVILEGIOS DE PATENTE DE INVENCION en todo el mundo, especialmente en los países arriba mencionados revindicar para los mismos el derecho de prioridad de la primera solicitud presentada en el país arriba mencionado de acuerdo con los convenios internacionales.

Firmado en

el

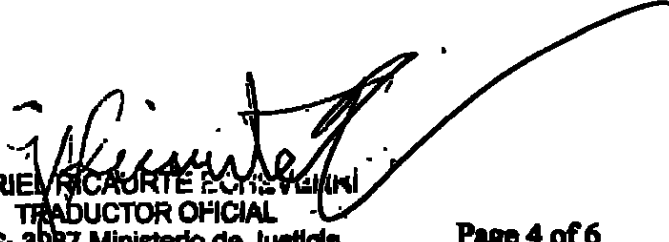
_____ Josef Endl

_____ Martín Lanzendoerfer

_____ Ralf Schumacher

_____ Stefan Seeber

Firmado en


GABRIEL RICARTE ECHEGARAY
TRADUCTOR OFICIAL
RES. 3987 Ministerio de Justicia
de agosto 17 de 1981

Page 4 of 6

24



Firmado por María Elena Fuentes



GABRIEL SUAREZ E ECHEVERRI
 TRADUCTOR OFICIAL
 RES. 3987 Ministerio de Justicia
 de agosto 17 de 1965

240

Testimonian mi mano y el sello oficial

Firma Christina G Myers
Firma del Notario

Sello oficial de caucho

Christina G Myers

Comisión # 1555172

Notario Público – California

Condado de Santa Clara

Mi comisión expira 9 de marzo de 2009

En el extremo izquierdo del sello aparece un logo con la leyenda "El Gran sello del Estado de California" con figura en el centro. En los extremos derecho e izquierdo del sello aparece escrito las letras NNAI

SECCIÓN OPCIONAL

ESTE CERTIFICADO DEBE ESTAR ADJUNTO AL DOCUMENTO DESCRITO A LA DERECHA
TITULO O TIPO DE DOCUMENTO : TRASPASO PARA LA PRESENTACIÓN DE LA SOLICITUD EUROPEA CON SERIE NOS. EP 04022158.2 Y EP 04030546.8 EN SUIZA. BASILEA CASO 22672—EXPEDIENTE R0229

AUNQUE LA INFORMACIÓN REQUERIDA AQUÍ NO ES REQUERIDA POR LA LEY, ESTA PODRÍA PREVENIR ADJUNTOS FRAUDULENTOS DE ESTE FORMULARIO

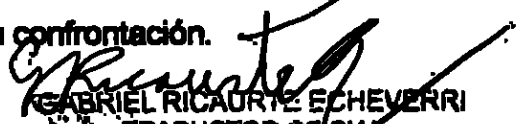
NÚMERO DE PÁGINAS___ FECHA DE _____

OTRAS FIRMAS APARTE DE LAS NOMBRADAS: _____

=====

Es traducción fiel y completa de un documento escrito en inglés del cual queda copia en esta oficina ya la cual me remito para su confrontación.

Derechos de traducción: \$ 102.000


GABRIEL RICAURTE ECHEVERRI
TRADUCTOR OFICIAL
NOS. 3987 Ministerio de Justicia
17 de agosto de 1981

243

241

Case 22672

Colombia

Declaration

I, the undersigned Notary public of Basle/Switzerland, herewith declare that the copy entitled Assignment is a true copy of the original document which has been presented to me by

F. Hoffmann-La Roche AG

of Basle/Switzerland.

Basle/Switzerland, this 14-03-2007 (fourteenth day of March two thousand and seven)

Dr. P. Kuster
MKW

Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basel

Les. P. 207 No. 44



APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz/Suisse)

This official document

2. is signed by *P. Kuster*

3. in his/her function as *off. Notar*

4. and certified by the seal of the *Basel-Stadt*

Certified 15. März 2007

5. in Basel (Basle)

6. on

7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

2. 8. 15. 1964

8. Seal/Stamp:

10. Signature:

Heldi Fischer

244

Assignment

I/WE, the undersigned

Josef Rndl, biologist, a German citizen
Ulmenstrasse 12, D-82362 Weilheim, Germany

Elsie M. Bugul, research scientist, an Argentine citizen
2513 Hasting Dr, Belmont, California 94002, USA

Maria Elena Fuentes, biologist, a ^{US} ~~German~~ citizen
1413 South Mary Ave, Sunnyvale, California 94087, USA

Yvo Graus, scientist, a Dutch citizen
Werdorperwaard 3, NL-3984 PR Odijk, Netherlands

Aran Frank Labrijn, scientist, a Dutch citizen
2e Jan van der Heijdenstraat 66-3R, NL-1074 XW Amsterdam, Netherlands

Martin Lanzendoerfer, biologist, a German citizen
Hofmairstrasse 25a, D-82327 Tutzing, Germany

Paul Parren, scientist, a Dutch citizen
Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk, Netherlands

Frank Rebers, scientist, a Dutch citizen
Adriaan Menninckkwartier 34, NL-3554 CT Utrecht, Netherlands

Ralf Schumacher, biologist, a German citizen
Hochfeldstrasse 78, D-82377 Penzberg, Germany

Stefan Seeber, biologist, a German citizen
Sealanger 34, D-82377 Penzberg, Germany

Jan van de Winkel, scientist, a Dutch citizen
Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist, Netherlands

Martine van Vugt, scientist, a Dutch citizen
Fluweelmoos 6, NL-3994 KR Houten, Netherlands

ASSIGNOR(S), herewith declare that I am/we are the sole/joint inventor(s) of the invention entitled:

Anti-OX40L Antibodies

for which the first application(s) was (were) filed as follows:

Country	Filing date	Serial No.
22672 EP	17.09.2004	04022158.2
22672 EP1	23.12.2004	04030546.8

and that for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, I/WE have sold, assigned and transferred all rights and title to and from the said invention and from the said application(s) in all countries of the world to the ASSIGNER:

F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstrasse
CH-4070 Basle (Switzerland)

Legalization required

242

The present assignment is for, but is not limited to the following countries:

Argentina, Australia, Austria, Belgium, Brazil, Canada, Chile, Colombia, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Israel, Italy, Japan, Kazakhstan, Korea, Luxembourg, Mexico, Monaco, Netherlands, New Zealand, Norway, Pakistan, People's Republic of China, Philippines, Poland, Portugal, Russia, Saudi Arabia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, Turkey, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, Ukraine, Uruguay, U.S.A., Venezuela.

By virtue of this assignment the said ASSIGNEE is fully entitled to apply for and obtain in their own name or in any other name and for their own purposes and account LETTERS PATENT in the whole world, especially in the above-named countries, and to claim therefor the right of priority of the first filed application(s) in the above-named country (countries) in accordance with international conventions.

Signed at
on

Josef Endl

Martin Lanzendoerfer

Ralf Schumacher

Stefan Seiber

Signed at
on

Yvo Graus

Aran Frank Labrijn

Paul Parren

Frank Rebers

Jan van de Winkel

Martine van Vugt

Signed at
on

Palo Alto, California, USA on August 9, 2005

Elsie M. Eugui

Elsie M. Eugui

Maria Elena Fuentes

Maria Elena Fuentes

CALIF RNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

United States of America)

State of California)

) ss.

County of Santa Clara)

On August 9, 2005, before me, Christina G. Myers, Notary Public,
DATE NAME, TITLE OF OFFICER - E.G., "JANE DOE, NOTARY PUBLIC"
 personally appeared Elsie M. Eugul and Maria Elena Fuentes
NAMES OF SIGNER(S)

☐ personally known to me - OR - ☒

proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the persons whose names are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that they executed the same in their authorized capacities, and that by their signatures on the instrument the persons, or the entity upon behalf of which the persons acted, executed the instrument.



WITNESS my hand and official seal.

Christina G. Myers
 SIGNATURE OF NOTARY

OPTIONAL SECTION

CAPACITY CLAIMED BY SIGNER

Though statute does not require the Notary to fill in the data below, doing so may prove invaluable to persons relying on the document.

- ☒ INDIVIDUAL
☐ CORPORATE OFFICER(S)

- TITLE(S)
☐ PARTNER(S) ☐ LIMITED
☐ GENERAL
☐ ATTORNEY-IN-FACT
☐ TRUSTEE(S)
☐ GUARDIAN/CONSERVATOR
☐ OTHER: _____

SIGNER IS REPRESENTING:
 NAME OF PERSON(S) OR ENTITY(ES)
 self

OPTIONAL SECTION

THIS CERTIFICATE MUST BE ATTACHED TO THE DOCUMENT DESCRIBED AT RIGHT

TITLE OR TYPE OF DOCUMENT: ASSIGNMENT FOR THE FILING OF EUROPEAN APPLICATION SERIAL NOS. EP 04022158.2 AND EP 04030546.8 IN SWITZERLAND BASEL CASE 22672 (DOCKET R0228)

Though the data requested here is not required by law, it could prevent fraudulent reattachment of this form.

NUMBER OF PAGES _____ DATE OF _____

SIGNER(S) OTHER THAN NAMED: _____

G. Ricarte
 GABRIEL RICAURTE ECHEVERRI
 TRADUCTOR OFICIAL
 RES. 3987 Ministerio de Justicia
 de agosto 17 de 1981

Traducción Oficial N° 02-26-132

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ibar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 5 1961)

1. País: **Suiza (Schweiz / Suisse)**
2. El presente Documento Oficial ha sido firmado por: **(ilegible)**
3. actuando en calidad de: **(ilegible)**
4. lleva el sello y estampilla de: **(ilegible)**

CERTIFICADO

5. en **Basel**
6. el día **veintisiete (27) de Septiembre de 2005**
7. por la **Cancillería Estatal del Canton de Basel-Stadt**
8. Número: **9.240/15.217**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: **(ilegible)**

**COPIA FIRMADA POR EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS**
2/5m español
828707

**MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES**

**2007 FEB 27 A 1:00
JEFES DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.**
1105

**NO ASOME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO**

Heidi Fisher**N. del T.: hay un sello Impreso: State Chancery – Basle City**

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjencia No. 0920
Agosto de 1996

242

245

Colombia

Caso 22672

DECLARACIÓN

Yo, el suscrito Notario Público de Basle/Suiza, por medio del presente declaro que la copia adjunta intitulada "Traspaso" es una copia fiel del documento original, el cual me ha sido presentado por:

F. Hoffmann – La Roche AG**De Basle, Suiza****Este día veintiséis (26) de Septiembre de (dos mil cinco) 2005**

Firma (ilegible) Dr. Peter Kuster – Abogado y Notario – Peterskirchplatz 12 – Postfach – CH-4001 Basel.

Log. Prot. 2005 N° 295

N. del T. el presente documento consta de cuatro (4) hojas sujetas mediante un hilo blanco-negro, el cual a su vez está sujeto bajo un sello/estampilla blanco, con la leyenda: "PETER KRUSTER – NOTARIUS BASILIENSIS"

IBARRA A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0929
Agosto de 1996

243

Caso 22672

TRASPASO**Yo, Nosotros, los suscritos****Josef Endl, biólogo, un ciudadano Alemán****Ulmenstrasse 12, D-82362 Wellheim, Alemania****Elsie Eugui, científico investigador, un ciudadano Argentino****2513 Hasting Dr, Belmont, California 94002, USA****Maria Elena Fuentes, bióloga, un ciudadano de U.S.A.****1490Bittern Drive, Sunnyvale, California 94087, USA****Yvo Graus, científico, un ciudadano Holandés****Werdorperwaard 3, NL-3984 PR Odijk, Netherlands****Aran Frank Labrijn, científico, un ciudadano Holandés****2e Jan van der Heijdenstraat 66-3R, NL-1074 XW Amsterdam, Netherlands****Martin Lanzendoerfer, biólogo, un ciudadano Alemán****Hofmairstrasse 25a, D-82327 Tutzing, Alemania****Paul Parren, científico, un ciudadano Holandés****Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk, Netherlands****Frank Rebers, científico, un ciudadano Holandés****Adriaan Menninckkwartier 34, NL-3554 CT Utrecht, Netherlands****Ralf Schumacher, biólogo, un ciudadano Alemán****Hochfeldstrasse 78, D-82377 Penzberg, Alemania****Stefan Seeber, biólogo, un ciudadano Alemán****Breunetsrieder Weg 22 D-82377 Penzberg, Alemania****Jan van de Winkel, científico, un ciudadano Holandés****Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist, Netherlands****Martine van Vugt, científico, un ciudadano Holandés****Fluweelmos 6, NL-3994 KR Houten, Netherlands**


ILBARA. ESPAÑOL Y ESPAÑOL
Traducción : Oficial
... (inglés)
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

249

247

CEDENTE (S), con el presente declara que soy/somos el único/colectivamente inventor(es) de la Invención intitulada:

"ANTICUERPOS ANTI - OX40L"

Para la cual la primera solicitud (es) fue (fueron) registrados de la manera siguiente:

País	Fecha de Registro	Serie Nº
22672 EP	17.09.2004	04022158.2
22672 EP1	23.12.2004	04030546.8

Y que por una contraprestación válida y efectiva cuya recepción y suficiencia se reconoce por el presente Yo/nosotros hemos vendido, asignado y transferido todos los derechos y título para y de dicha Invención y de dicha solicitud (es) en todos los países del mundo al CESIONARIO:

F. Hoffmann-La RocheAG

124 Grenzacherstrasse

CH-4070 Basle (Switzerland)

El presente Traspaso es para, pero no está limitado a los siguientes países:

Argentina, Australia, Austria, Bélgica, Brasil, Canadá, Chile, Colombia, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda, Israel, Italia, Japón, Kazakstán, Corea, Luxemburgo, México, Mónaco, Los Países Bajos, Nueva Zelanda, Noruega, Pakistán, República de la Gente de China, Filipinas, Polonia, Portugal, Rusia, Arabia Saudita, África del Sur, España, Suecia, Suiza, Taiwán, Turquía, Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte, Ucrania, Uruguay, U. S.A., Venezuela.

En virtud de este Traspaso, dicho Cesionario está plenamente facultado para solicitar y obtener en su propio nombre o en cualquier otro nombre y para sus propios objetivos y consideraciones PATENTES en todo el mundo, especialmente en los países antes nombrados, de conformidad con los convenios internacionales.

Firmado en Utrecht

Fecha: ocho (8) de Agosto de 2005.

N. del T.: hay seis firmas ilegibles de: Yvo Grauss, Aran Frank Labrijn, Paul Parren, Frank Rebers, Jan Van Winkel y Martine van Vugt,

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

260

248

N ARIELE BEROEPSORGANISATIE – KONINKLIJKE.

Visto por mí, Sr., Job Broos, candidato Civil Notario Legal, cómo sustituto del Sr., Bart Herman Theodor Terhorst, Notario de Derecho Civil en Utrecht, Países Bajos (Netherlands), para la legalización de las firmas sobre el documento adjunto, de:

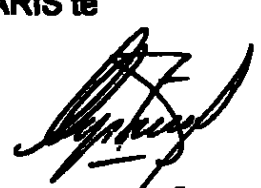
1. Mr. Ivo M.F. Graus, nacido en Velsen, The Netherlands, en Marzo 1, 1963, Licencia de conducir N° 3114127438;
2. Mr. Paul Willem Henri Ida Parren, nacido en Roermond, The Netherlands, en Abril 30, 1963, pasaporte N° NB5216950;
3. Mr. Johannes Gerardus Joseph van de Winkel, nacido en Venray, The Netherlands en Marzo 1º, 1961, pasaporte N° ND2487742;
4. Mr. Aran Prank Labrijn, nacido en Amsterdam, The Netherlands, en Agosto 11, 1972, pasaporte N° NE5121617;
5. Mr. Frank E.M. Rebers, nacido en Sliedrecht, The Netherlands, en Octubre 15, 1968, licencia de conducir N° 3206168425;
6. Ms. Martine Jannigje van Vugt, nacida en Werkendam, The Netherlands, en Marzo 3, 1970, pasaporte N° M10760556.

Firmado en Utrecht, Países bajos

Fecha Agosto 8, 2005.

Firma (ilegible)

N. del T.: Hay un sello/emblema de tinta en la parte superior izquierda y en la parte inferior izquierda con la leyenda: Mr B.H. TERHORST – NOTARIS te UTRECHT.


ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpreté Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

261

249

Colombia

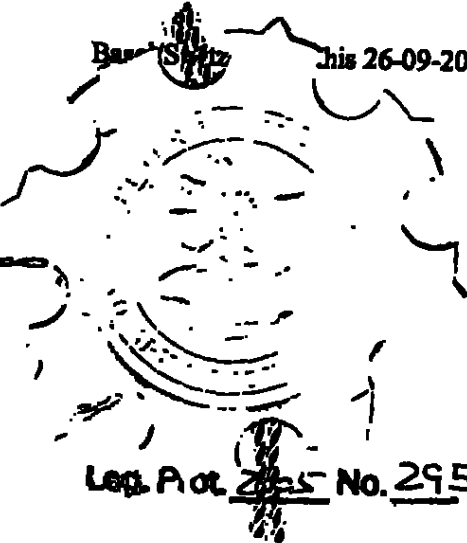
Case 22672

Declaration

I, the undersigned Notary public of Basle/Switzerland, herewith declare that the annexed copy entitled 'Assignment' is a true copy of the original document which has been presented to me by

F. Hoffmann-La Roche AG

of Basle/Switzerland.



this 26-09-2005 (twenty-sixth day of September two thousand five)

Dr. P. Kuster
Notar

Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basel

APOSTILLE
(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)
This official document

2. is signed by *Dr. P. Kuster*

3. in his/her function as *Notar*

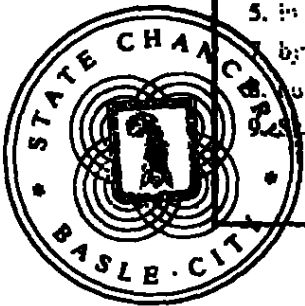
4. and certified by the seal of the *Basle*

Certified **27. Sep. 2005**

5. in Basel (Bâle) 6. on

7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt
9'240/15'277

9. Seal / stamp: 10. Signature: *Heldi Fischer*
Heldi Fischer



242

Assignment

I/WE, the undersigned

Josef Endl, biologist, a German citizen
Ulmenstrasse 12, D-82362 Weilheim, Germany

Elaie-Mr Bugui, research scientist, an Argentine citizen
2513 Hasting Dr, Belmont, California 94002, USA

Maria Elena Puentes, biologist, a ^{US} ~~Chinese~~ citizen
1413 South Mary Ave, Sunnyvale, California 94087, USA 1490 Bittern Drive

Yvo Graus, scientist, a Dutch citizen
Werdorperwaard 3, NL-3984 PR Odiijk, Netherlands

Aran Frank Labrijn, scientist, a Dutch citizen
2e Jan van der Heijdenstraat 66-3R, NL-1074 XW Amsterdam, Netherlands

Martin Lanzendoerfer, biologist, a German citizen
Hofmairstrasse 25a, D-82327 Tutzing, Germany

Paul Parren, scientist, a Dutch citizen
Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odiijk, Netherlands

Frank Rebers, scientist, a Dutch citizen
Adriaan Menninckkwartier 34, NL-3554 CT Utrecht, Netherlands

Ralf Schumacher, biologist, a German citizen
Hochfeldstrasse 78, D-82377 Penzberg, Germany

Stefan Seeber, biologist, a German citizen
Gachinger 34, D-82377 Penzberg, Germany Breunetsrieder Weg 22

Jan van de Winkel, scientist, a Dutch citizen
Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist, Netherlands

Martine van Vugt, scientist, a Dutch citizen
Fluweelmos 6, NL-3994 KR Houten, Netherlands

ASSIGNOR(S), herewith declare that I am/we are the sole/joint inventor(s) of the invention entitled:

Anti-OX40L Antibodies

for which the first application(s) was (were) filed as follows:

Country	Filing date	Serial No.
22672 EP	17.09.2004	04022158.2
22672 EP1	23.12.2004	04030546.8

and that for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, I/WE have sold, assigned and transferred all rights and title to and from the said invention and from the said application(s) in all countries of the world to the ASSIGNEE:

F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstrasse
CH-4070 Basle (Switzerland)

Legalization required *by notary public*

15
The present assignment is for, but is not limited to the following countries:

Argentina, Australia, Austria, Belgium, Brazil, Canada, Chile, Colombia, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Israel, Italy, Japan, Kazakhstan, Korea, Luxembourg, Mexico, Monaco, Netherlands, New Zealand, Norway, Pakistan, People's Republic of China, Philippines, Poland, Portugal, Russia, Saudi Arabia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, Turkey, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, Ukraine, Uruguay, U.S.A., Venezuela.

By virtue of this assignment the said ASSIGNEE is fully entitled to apply for and obtain in their own name or in any other name and for their own purposes and account LETTERS PATENT in the whole world, especially in the above-named countries, and to claim therefor the right of priority of the first filed application(s) in the above-named country (countries) in accordance with international conventions.

Signed at
on

Josef Endl

Martin Lanzendoerfer

Ralf Schumacher

Stefan Seiber

Signed at
on

Utrecht
August 8, 2005

Yvo Graus

Aran Frank Labrijn

Paul Parren

Frank Rebers

Jan van de Winkel

Martine van Vugt

Signed at
on

Elcic-El Eugui

Maria Elena Fuentes

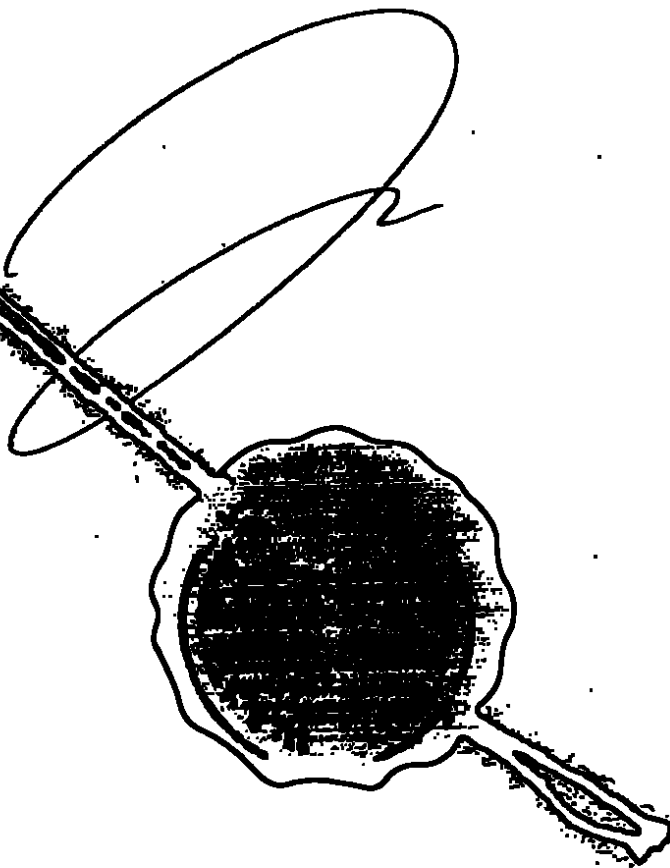
52



Seen by me, Mr. Job Broos, candidate Civil Law Notary, as substitute of Mr. Bart Herman Theodor Terhorst, Civil Law Notary in Utrecht, The Netherlands, for the legalization of the signatures on the attached document, of:

1. Mr. Ivo M.F. Graus, born in Velsen, The Netherlands, on March 1, 1963, driving license number 3114127438;
2. Mr. Paul Willem Henri Ida Parren, born in Roermond, The Netherlands, on April 30, 1963, passport number NB5216950;
3. Mr. Johannes Gerardus Joseph van de Winkel, born in Venray, The Netherlands, on March 1, 1961, passport number ND2487742;
4. Mr. Aran Frank Labrijn, born in Amsterdam, The Netherlands, on August 11, 1972, passport number NE5121617;
5. Mr. Frank E.M. Rebers, born in Sliedrecht, The Netherlands, on October 15, 1968, driving license number 3206168425;
6. Ms. Martine Jannigje van Vugt, born in Werkendam, The Netherlands, on March 3, 1970, passport number M10760556.

Signed in Utrecht, The Netherlands
August 8, 2005



265

252

Traducción Oficial N° 02-26-133

**Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en inglés, el cual para identificación lleva el sello de libro
A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0020, 1996 del Ministerio de Justicia,
República de Colombia.**

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 5 1961)

MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES
828708
Alber Espinal
CITA PARA APARECER EN EL
DOCUMENTO DESEMPENAR
LAS FUNCIONES INDICADAS

1. País: **Sulza (Schweiz / Suisse)**
2. El presente Documento Oficial ha sido firmado por: **(ilegible)**
3. actuando en calidad de: **(ilegible)**
4. lleva el sello y estampilla de: **(ilegible)**

CERTIFICADO

5. en **Basel**
6. el día **veintisiete (27) de Septiembre de 2005**
7. por la **Cancillería Estatal del Canton de Basel-Stadt**
8. Número: **9.241/15.218**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: **(ilegible)**

NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO
2005 FEB 27 A 1:09
Jefe de LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

Heidi Fisher

N. del T.: hay un sello Impreso: State Chancery – Basle City

ELBARA. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Ministerial No. 0920
Agosto de 1996

256

Colombia

Caso 22672

DECLARACIÓN

Yo, el suscrito Notario Público de Basle/Sulza, por medio del presente declaro que la copia adjunta intitulada "Traspaso" es una copia fiel del documento original el cual me ha sido presentado por:

F. Hoffmann – La Roche AG**De Basle, Suiza****Este día veintiséis (26) de Septiembre de (dos mil cinco) 2005**

Firma (ilegible) Dr. Peter Kuster – Abogado y Notario – Peterskirchplatz 12 –
Postfach – CH-4001 Basel.

Log. Prot. 2005 N° 298

N. del T. el presente documento consta de seis (6) hojas sujetas mediante un hilo blanco-negro, el cual a su vez está sujeto bajo un sello/estampilla blanco, con la leyenda: "PETER KRUSTER – NOTARIUS BASILIENSIS"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

25

Caso 22672

TRASPASO

Yo, Nosotros, los suscritos:

Josef Endl, biólogo, un ciudadano Alemán
Ulmenstrasse 12, D-82362 Weilheim, Alemania

Elsie Eugui, científico investigador, un ciudadano Argentino
2513 Hasting Dr, Belmont, California 94002, USA

Maria Elena Fuentes, bióloga, un ciudadano de U.S.A.
1490 Bittern Drive, Sunnyvale, California 94087, USA

Yvo Graus, científico, un ciudadano Holandés
Werdorperwaard 3, NL-3984 PR Odijk, Netherlands

Aran Frank Labriijn, científico, un ciudadano Holandés
2e Jan van der Heijdenstraat 66-3R, NL-1074 XW Amsterdam, Netherlands

Martin Lanzendoerfer, biólogo, un ciudadano Alemán
Hofmairstrasse 25a, D-82327 Tutzing, Alemania

Paul Parnen, científico, un ciudadano Holandés
Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk, Netherlands

Frank Rebers, científico, un ciudadano Holandés
Adriaan Menninckkwartier 34, NL-3554 CT Utrecht, Netherlands

Ralf Schumacher, biólogo, un ciudadano Alemán
Hochfeldstrasse 78, D-82377 Penzberg, Alemania

Stefan Seeber, biólogo, un ciudadano Alemán
Breunetsrieder Weg 22 D-82377 Penzberg, Alemania

Jan van de Winkel, científico, un ciudadano Holandés
Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist, Netherlands


ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

268

250

Martine van Vugt, científico, un ciudadano Holandés
Fluweelmos 6, NL-3994 KR Houten, Netherlands

CEDENTE (S), con el presente declara que soy/somos el único/colectivamente inventor(es) de la invención intitulada:

"ANTICUERPOS ANTI – OX40L"

Para la cual la primera solicitud (es) fue (fueron) registrados de la manera siguiente:

<u>País</u>	<u>Fecha de Registro</u>	<u>Serie N°</u>
22672 EP	17.09.2004	04022158.2
22672 EP1	23.12.2004	04030546.8

Y que por una contraprestación válida y efectiva cuya recepción y suficiencia se reconoce por el presente Yo/nosotros hemos vendido, asignado y transferido todos los derechos y título para y de dicha invención y de dicha solicitud (es) en todos los países del mundo al CESIONARIO:

F. Hoffmann-La RocheAG
124 Grenzacherstrasse
CH-4070 Basle (Switzerland)

El presente Traspaso es para, pero no está limitado a los siguientes países:

Argentina, Australia, Austria, Bélgica, Brasil, Canadá, Chile, Colombia, República Checa Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda, Israel, Italia, Japón, Kazakstán, Corea, Luxemburgo, México, Mónaco, Los Países Bajos, Nueva Zelanda, Noruega, Pakistán, República de la Gente de China, Filipinas, Polonia, Portugal, Rusia, Arabia Saudita, Africa del Sur, España, Suecia, Suiza, Taiwán, Turquía, Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte, Ucrania, Uruguay, U. S.A., Venezuela.

En virtud de este Traspaso, dicho Cesionario está plenamente facultado para solicitar y obtener en su propio nombre o en cualquier otro nombre y para sus propios objetivos y consideraciones, PATENTES en todo el mundo, especialmente en los países antes nombrados, de conformidad con los convenios internacionales.



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Ministerial No. 0920
Ago 20, 1955

269

25X

N. del T.: hay seis firmas ilegibles de: Josef Endl, Martin Lanzendoerfer, Ralf Schumacher y Stefan Seeber.

Firmadas en Penzberg, en Agosto 23, 2005; Agosto 02, 2005; Agosto 23, 2005; Agosto 8, 2005, respectivamente.

N. del T. Hay tres (3) hojas identificadas con los números URNr. K 1544 / 2005, fecha: Penzberg, Agosto 2, 2005; K 1598 / 2005 fecha: Penzberg, Agosto 08, 2005; Firmadas por Nikolaus Klocker, Notario en Weilheim i. OB.

URNr.D1241 / 2005. fecha: Penzberg, Agosto 23, 2005, firmada por Dr. Wolfgang Drasch LL.M., Notario en Weilheim i. OB.

EL BAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Ministerial No. 0920
Agosto 06 1993

260

258

Colombia

Case 22672

Declaration

I, the undersigned Notary public of Basle/Switzerland, herewith declare that the annexed copy entitled 'Assignment' is a true copy of the original document which has been presented to me by

F. Hoffmann-La Roche AG

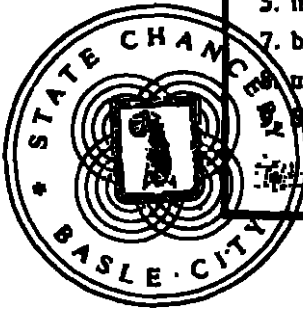
of Basle/Switzerland.

his 26-09-2005 (twenty-sixth day of September two thousand five)

Dr. P. Kuster
Notar

Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basle

Leg. Proc. No. 296



APOSTILLE
(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)
This official document

2. is signed by *Dr. Peter Kuster*

3. in his/her function as *Notar*

4. and certified by the seal of the *Notar*

Certified **27. Sep. 2005**

5. in Basel (Basle) 6. on

7. by the State Chancery of the Canton of Basle-Stadt

8. No. *9.242/15.2-1f*

9. Seal/stamp: 10. Signature: *Fischer*
Heidi Fischer

261

Assignment

259

I/WE, the undersigned

Josef Rndl, biologist, a German citizen
Ulmenstrasse 12, D-82362 Weilheim, Germany

Elie M. Bugui, research scientist, an Argentine citizen
2513 Hasting Dr, Belmont, California 94002, USA

US
Maria Elena Fuentes, biologist, a Chilean citizen
~~1413 South Mary Ave~~, Sunnyvale, California 94087, USA 1490 Bittern Drive

Yvo Graus, scientist, a Dutch citizen
Werdorperwaard 3, NL-3984 PR Odijk, Netherlands

Aran Frank Labrijn, scientist, a Dutch citizen
2e Jan van der Heijdenstraat 66-3R, NL-1074 XW Amsterdam, Netherlands

Martin Lanzendoerfer, biologist, a German citizen
Hofmairstrasse 25a, D-82327 Tutzing, Germany

Paul Parren, scientist, a Dutch citizen
Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk, Netherlands

Frank Rebers, scientist, a Dutch citizen
Adriaan Menninckkwartier 34, NL-3554 CT Utrecht, Netherlands

Ralf Schumacher, biologist, a German citizen
Hochfeldstrasse 78, D-82377 Penzberg, Germany

Stefan Seeber, biologist, a German citizen
~~Sealanger 34~~, D-82377 Penzberg, Germany Breunetsrieder Weg 22

Jan van de Winkel, scientist, a Dutch citizen
Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist, Netherlands

Martine van Vugt, scientist, a Dutch citizen
Flurweelmos 6, NL-3994 KR Houten, Netherlands

ASSIGNOR(S), herewith declare that I am/we are the sole/joint inventor(s) of the invention entitled:

Anti-OX40L Antibodies

for which the first application(s) was (were) filed as follows:

Country	Filing date	Serial No.
22672 EP	17.09.2004	04022158.2
22672 EP1	23.12.2004	04030546.8

and that for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, I/WE have sold, assigned and transferred all rights and title to and from the said invention and from the said application(s) in all countries of the world to the ASSIGNEE:

F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstrasse
CH-4070 Basle (Switzerland)

Legalization required

26

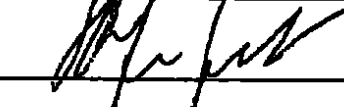
260

The present assignment is for, but is not limited to the following countries:

Argentina, Australia, Austria, Belgium, Brazil, Canada, Chile, Colombia, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Israel, Italy, Japan, Kazakhstan, Korea, Luxembourg, Mexico, Monaco, Netherlands, New Zealand, Norway, Pakistan, People's Republic of China, Philippines, Poland, Portugal, Russia, Saudi Arabia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, Turkey, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, Ukraine, Uruguay, U.S.A., Venezuela.

By virtue of this assignment the said ASSIGNEE is fully entitled to apply for and obtain in their own name or in any other name and for their own purposes and account LETTERS PATENT in the whole world, especially in the above-named countries, and to claim therefor the right of priority of the first filed application(s) in the above-named country (countries) in accordance with international conventions.

Signed at
on

	Josef Endl	Penzberg, 23 rd August 2005
	Martin Lanzendoerfer	Penzberg, August 2 nd , 2005
	Ralf Schumacher	Penzberg, 23 rd August, 2005
	Stefan Seiber	Penzberg, August 8 th . 2005

Signed at
on

_____	Yvo Graus
_____	Aran Frank Labriijn
_____	Paul Parren
_____	Frank Rebers
_____	Jan van de Winkel
_____	Martine van Vugt

Signed at
on

_____	Elsie-M. Eugui
_____	Maria Elena Fuentes

263

URNr. **K 1544** / 2005

vom 2. August 2005 / li

Ich beglaubige die vorstehende, vor mir vollzogene Unterschrift von

Herrn Dr. Martin Lanzendörfer, geboren am 29. Januar 1964, Dipl. Biologe,
Hofmairstr. 25 a, 82327 Tutzing,
ausgewiesen durch amtlichen Lichtbildausweis.

Penzberg, 2. August 2005



A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'K' followed by a horizontal line.

Nikolaus Klöcker,
Notar in Weilheim i. OB.

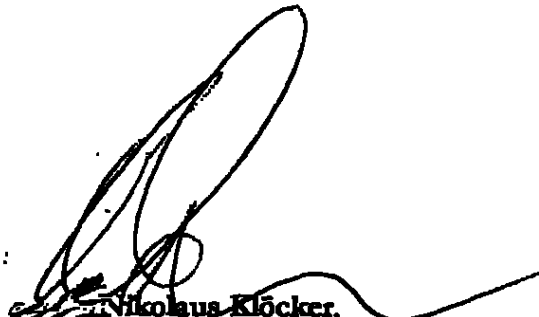
URNr. K 1598 / 2005

vom 8. August 2005 / li

Ich beglaubige die vorstehende, vor mir vollzogene Unterschrift von

Herrn Dr. Stefan Seeber, geboren am 22. September 1960, Dipl. Biologe,
Breunetsrieder Weg 22, 82377 Penzberg,
ausgewiesen durch amtlichen Lichtbildausweis.

Penzberg, 8. August 2005



Nikolaus Klöcker,
Notar in Weilheim i. OB.

262

262

263

URNr. D 1241 / 2005

vom 23. August 2005 / li

Ich beglaube die vorstehenden, vor mir vollzogenen Unterschriften von

Herrn Dr. Ralf Schumacher, geboren am 12. Februar 1963, Biologe,
Hochfeldstraße 78, 82377 Penzberg,
ausgewiesen durch amtlichen Lichtbildausweis, und

Herrn Dr. Josef Georg Endl, geboren am 31. Juli 1950, Biologe, Ulmenstraße 12,
82362 Weilheim,
ausgewiesen durch amtlichen Lichtbildausweis.

Penzberg, 23. August 2005



Dr. Wolfgang Drasch LL.M.,
Notar in Weilheim i. OB.

266

Carrera 13 No 27-00 Piso 5 7 y 10
Conmutador 3 82 08 40
Fax 350 52 20
E mail info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá D C Colombia

265

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI

2020
Bogotá D.C.,

Folio 268

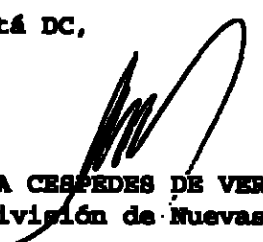
Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
F. HOFFMANN LA ROCHE AG

REFERENCIA	Radicación No.	7 32757
	Solicitud internacional	PCT/EP2005/009968
	Fecha inicio fase nacional	17/04/2007
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio No.	3433
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

30 JUL 2007


ALIX CARMENXA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

adpall