



Industria y Comercio
SUPERINTENDEN

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-026118- -00000-0000

Fecha: 2014-02-07 14:30:30
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 276 277

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TÍTULO** _____ ANTICUERPOS QUE SE UNEN A OX40 Y SUS USOS

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** _____ A61P 37/06; A61K 39/395;
C07K 16/28

71. **SOLICITANTE** _____ GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.

DOMICILIO _____ La Chaux-De-Fonds Suiza

74. **APODERADO** _____ GERMAN CASTILLO GRAU

22. **BOGOTÁ, D.C.,** _____ 2014



No. 14-026118- -00000-0000

Fecha: 2014-02-07 14:30:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 278 277

DIRECCION
SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1	TIPO SE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/ IB2012/053502	Fecha Julio 9, 2012
Publicación Internacional No.		WO 2013/008171 A1	Fecha Enero 17, 2013
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
ANTICUERPOS QUE SE UNEN A OX40 Y SUS USOS			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
A61P 37/06; A61K 39/395; C07K 16/28			
5	SOLICITANTE (S)	☐ Esta persona también es inventor.	Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria
GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.		IDENTIFICACIÓN	TIPO
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		Chemin de la Combeta, 5	No. TELÉFONO
CIUDAD		La Chaux-De-Fonds	CORREO ELECTRÓNICO
PAÍS		Suiza	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN Suiza
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
1	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
2	Attinger	Antoine	Suiza
3	Blein	Stanislas	Francia
4	Back	Jonathan Albert	Francia
5	Lissilaa	Rami	Francia
6	Hou	Samuel	Suiza
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
1	PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD DIRECCIÓN
2	Suiza		La Chaux-De-Fonds Chemin de la Combeta, 5
3	Suiza		La Chaux-De-Fonds Chemin de la Combeta, 5
4	Suiza		La Chaux-De-Fonds Chemin de la Combeta, 5
5	Suiza		La Chaux-De-Fonds Chemin de la Combeta, 5
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
GERMAN CASTILLO GRAU		IDENTIFICACION C.C. 17.017.671 de TP 2.978 del Bogotá C.S.J.	
DIRECCIÓN		Carrera 13 No. 37-43 Piso 12	No. TELÉFONO 285 7460
CIUDAD		Bogotá, D.C.	CORREO ELECTRÓNICO info@castillograu.c
PAÍS		Colombia	No. RADICACIÓN O PORTOCOLO DE PODER GENERAL

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAIS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
2 3 E.U.A.			61/506,491	Julio 11, 2011
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen,				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente,				
12	DECLARACION SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicional de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de la patente.				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐				
Universidades públicas o privadas ☐				
Entidades sin ánimo de lucro ☐				
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
14	AUTORIZACION DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☒ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.				
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO		No.	Fecha.
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el pectorio)				
GERMAN CASTILLO GRAU				
17	ANEXOS			
Documentación Técnica		Documentación Jurídica		
Solicitud Internacional en Castellano				
1	☒ Descripción	No. De folios:	9	☒ Poderes, si fuera el caso.
2	☒ Reivindicaciones	No. Reivindicaciones:	10	☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante
3	☒ Dibujos y/o figuras	No. Folios:	11	☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado número de registro, si fuera al caso
4	☒ Resumen		12	☐ Copia de la licencia o autorización de conocimientos Tradicionales, o certificado o número de registro, si fuera el caso
5	☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso		13	☐ Reducción de tasas
6	☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7	☐ Arte final 12 x 12		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea	
8	☐ Anexo formato digital		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004	
			Universidades públicas o privadas	
			☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
			Entidades sin ánimo de lucro	
			☐ Copia de regido vigente en Cámara de comercio	
			☐ Hoja de información complementaria	
			☐ Otros, especificar	
			16	☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
			17	☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
			18	☐ Comprobante de pago de la tasa de concepto de excedente de palabras en la publicación
			19	☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10

3

	EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN ☒ Patente de Invención ☐ Patente modelo de utilidad ☒ PCT
(21) No. De solicitud	(51) int. Cl:
(22) Fecha de solicitud	(71) Solicitante (s) GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.
(30) Prioridad SI (31) No. Prioridad 61/506,491 (32) Fecha: Julio 11, 2011 (33) País: E.U.A.	(72) Interventor (es) Attienger Antonie; Blein Stanislas; Back Jonathan Albert; Lissilaa Rami; Hou Samuel
(74) Apoderado (s) GERMAN CASTILLO GRAU	
(54) Título ANTICUERPOS QUE SE UNEN A OX40 Y SUS USOS	
Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT	
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud Fecha Julio 09, 2012 No. de solicitud PCT/ IB2012/053502	(87) Publicación internacional Fecha Enero 17, 2013 No. Publicación WO 2013/008171 A1
Resumen reivindicación (es): La presente invención se refiere a anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen a OX40 de humano; más específicamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y/o que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.	

24

ASSIGNMENT

I, **Antoine ATTINGER**, having an address c/o GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A., Chemin de la Combeta 5, 2300 La Chaux-de-Fonds, Switzerland (hereinafter called "ASSIGNOR") in consideration of the sum of One Dollar (\$1.00) or the equivalent thereof, and other good and valuable consideration, the sufficiency of which and receipt of which is hereby acknowledged, paid to me by

GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.

located at Chemin de la Combeta 5, 2300 La Chaux-de-Fonds, Switzerland (hereinafter called the "ASSIGNEE"), do hereby sell and assign to said ASSIGNEE, its successors and assigns, all my right, title and interest, throughout the world, including priority rights, in and to my Invention entitled:

"Antibodies that bind to OX40 and their uses"

invented by me, as a co-inventor, and described in the PCT application number **PCT/IB2012/053502** filed on **July 09, 2012** and/or improvements thereof and in all Letters Patents which may or shall be granted on said Invention, or any parts thereof, or on said application(s), or all national phase, divisions, continuations, continuation-in-parts, reissues, and extensions thereof and rights of priority therein, including the right to sue for past infringement and any such recovery, said interest being my entire ownership interest in said Letters Patent(s) when granted, to be held and enjoyed by said ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, to the full end of the term for which said Letters Patent(s) may be granted, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by me if this assignment and sale had not been made;

And I hereby agree to sign and execute any further documents or instruments which may be necessary, lawful, and proper in the prosecution of said above-named application(s) or in the preparation and prosecution of any national phase, divisional, continuing, continuation-in-part, substitute, renewal or reissue applications, or in any amendment, extension, or interference proceedings, or otherwise to secure the title thereto in said ASSIGNEE;

And I hereby authorize and request the Commissioner of Patents and Trademarks and any other granting authority to issue any Letters Patent resulting from said Invention and application(s) concerning same to said ASSIGNEE.

I declare under penalty of perjury under the laws of the United States of America and under penalty of the laws of any other jurisdiction before which this document may be presented, that I have signed this document as my own free act and that all of the foregoing is true and correct.

I hereby assent to the action already taken by the said ASSIGNEE in the above matter.

Signature (ASSIGNOR):

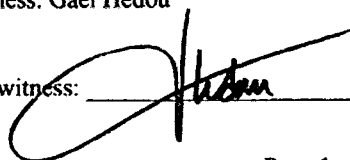


Dated:

August 22nd 2012

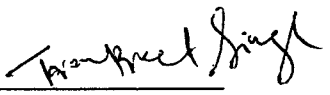
Name of witness: Gaël Hedou

Signature of witness:

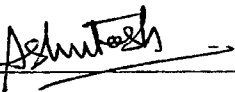


Acceptance by Assignee:

This is to memorialize that the foregoing assignment has been accepted by Glenmark Pharmaceuticals S.A.

Signature: 
Mr. Taranpreet Singh Lamba
General manager – IPM
Glenmark Pharmaceuticals Ltd.

Name of witness: **Mr. Ashutosh Bhargava**

Signature of witness: 

6

ASSIGNMENT

I, **Stanislas BLEIN**, having an address c/o GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A., Chemin de la Combeta 5, 2300 La Chaux-de-Fonds, Switzerland (hereinafter called "ASSIGNOR") in consideration of the sum of One Dollar (\$1.00) or the equivalent thereof, and other good and valuable consideration, the sufficiency of which and receipt of which is hereby acknowledged, paid to me by

GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.

located at Chemin de la Combeta 5, 2300 La Chaux-de-Fonds, Switzerland (hereinafter called the "ASSIGNEE"), do hereby sell and assign to said ASSIGNEE, its successors and assigns, all my right, title and interest, throughout the world, including priority rights, in and to my Invention entitled:

"Antibodies that bind to OX40 and their uses"

invented by me, as a co-inventor, and described in the PCT application number **PCT/IB2012/053502** filed on **July 09, 2012** and/or improvements thereof and in all Letters Patents which may or shall be granted on said Invention, or any parts thereof, or on said application(s), or all national phase, divisions, continuations, continuation-in-parts, reissues, and extensions thereof and rights of priority therein, including the right to sue for past infringement and any such recovery, said interest being my entire ownership interest in said Letters Patent(s) when granted, to be held and enjoyed by said ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, to the full end of the term for which said Letters Patent(s) may be granted, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by me if this assignment and sale had not been made;

And I hereby agree to sign and execute any further documents or instruments which may be necessary, lawful, and proper in the prosecution of said above-named application(s) or in the preparation and prosecution of any national phase, divisional, continuing, continuation-in-part, substitute, renewal or reissue applications, or in any amendment, extension, or interference proceedings, or otherwise to secure the title thereto in said ASSIGNEE;

And I hereby authorize and request the Commissioner of Patents and Trademarks and any other granting authority to issue any Letters Patent resulting from said Invention and application(s) concerning same to said ASSIGNEE.

I declare under penalty of perjury under the laws of the United States of America and under penalty of the laws of any other jurisdiction before which this document may be presented, that I have signed this document as my own free act and that all of the foregoing is true and correct.

I hereby assent to the action already taken by the said ASSIGNEE in the above matter.

Signature (ASSIGNOR):

Stanislas Blein

Dated: *14 August 2012*

Name of witness:

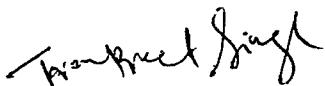
Sarah Thompson

Signature of witness:

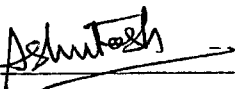
S Thompson

Acceptance by Assignee:

This is to memorialize that the foregoing assignment has been accepted by Glenmark Pharmaceuticals S.A.

Signature: 
Mr. Taranpreet Singh Lamba
General manager – IPM
Glenmark Pharmaceuticals Ltd.

Name of witness: **Mr. Ashutosh Bhargava**

Signature of witness: 

6

ASSIGNMENT

I, **Jonathan Albert BACK**, having an address c/o GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A., Chemin de la Combeta 5, 2300 La Chaux-de-Fonds, Switzerland (hereinafter called "ASSIGNOR") in consideration of the sum of One Dollar (\$1.00) or the equivalent thereof, and other good and valuable consideration, the sufficiency of which and receipt of which is hereby acknowledged, paid to me by

GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.

located at Chemin de la Combeta 5, 2300 La Chaux-de-Fonds, Switzerland (hereinafter called the "ASSIGNEE"), do hereby sell and assign to said ASSIGNEE, its successors and assigns, all my right, title and interest, throughout the world, including priority rights, in and to my Invention entitled:

"Antibodies that bind to OX40 and their uses"

invented by me, as a co-inventor, and described in the PCT application number **PCT/IB2012/053502** filed on **July 09, 2012** and/or improvements thereof and in all Letters Patents which may or shall be granted on said Invention, or any parts thereof, or on said application(s), or all national phase, divisions, continuations, continuation-in-parts, reissues, and extensions thereof and rights of priority therein, including the right to sue for past infringement and any such recovery, said interest being my entire ownership interest in said Letters Patent(s) when granted, to be held and enjoyed by said ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, to the full end of the term for which said Letters Patent(s) may be granted, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by me if this assignment and sale had not been made;

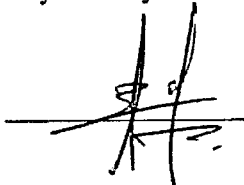
And I hereby agree to sign and execute any further documents or instruments which may be necessary, lawful, and proper in the prosecution of said above-named application(s) or in the preparation and prosecution of any national phase, divisional, continuing, continuation-in-part, substitute, renewal or reissue applications, or in any amendment, extension, or interference proceedings, or otherwise to secure the title thereto in said ASSIGNEE;

And I hereby authorize and request the Commissioner of Patents and Trademarks and any other granting authority to issue any Letters Patent resulting from said Invention and application(s) concerning same to said ASSIGNEE.

I declare under penalty of perjury under the laws of the United States of America and under penalty of the laws of any other jurisdiction before which this document may be presented, that I have signed this document as my own free act and that all of the foregoing is true and correct.

I hereby assent to the action already taken by the said ASSIGNEE in the above matter.

Signature (ASSIGNOR):

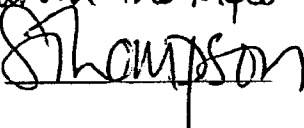


Dated: Aug 13th 2012

Name of witness:

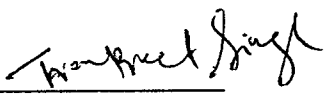
Sarah Thompson

Signature of witness:

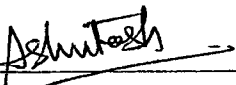


Acceptance by Assignee:

This is to memorialize that the foregoing assignment has been accepted by Glenmark Pharmaceuticals S.A.

Signature: 
Mr. Taranpreet Singh Lamba
General manager – IPM
Glenmark Pharmaceuticals Ltd.

Name of witness: **Mr. Ashutosh Bhargava**

Signature of witness: 

10

ASSIGNMENT

I, **Rami LISSILAA**, having an address c/o GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A., Chemin de la Combeta 5, 2300 La Chaux-de-Fonds, Switzerland (hereinafter called "ASSIGNOR") in consideration of the sum of One Dollar (\$1.00) or the equivalent thereof, and other good and valuable consideration, the sufficiency of which and receipt of which is hereby acknowledged, paid to me by

GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.

located at Chemin de la Combeta 5, 2300 La Chaux-de-Fonds, Switzerland (hereinafter called the "ASSIGNEE"), do hereby sell and assign to said ASSIGNEE, its successors and assigns, all my right, title and interest, throughout the world, including priority rights, in and to my Invention entitled:

"Antibodies that bind to OX40 and their uses"

invented by me, as a co-inventor, and described in the PCT application number **PCT/IB2012/053502** filed on **July 09, 2012** and/or improvements thereof and in all Letters Patents which may or shall be granted on said Invention, or any parts thereof, or on said application(s), or all national phase, divisions, continuations, continuation-in-parts, reissues, and extensions thereof and rights of priority therein, including the right to sue for past infringement and any such recovery, said interest being my entire ownership interest in said Letters Patent(s) when granted, to be held and enjoyed by said ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, to the full end of the term for which said Letters Patent(s) may be granted, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by me if this assignment and sale had not been made;

And I hereby agree to sign and execute any further documents or instruments which may be necessary, lawful, and proper in the prosecution of said above-named application(s) or in the preparation and prosecution of any national phase, divisional, continuing, continuation-in-part, substitute, renewal or reissue applications, or in any amendment, extension, or interference proceedings, or otherwise to secure the title thereto in said ASSIGNEE;

And I hereby authorize and request the Commissioner of Patents and Trademarks and any other granting authority to issue any Letters Patent resulting from said Invention and application(s) concerning same to said ASSIGNEE.

I declare under penalty of perjury under the laws of the United States of America and under penalty of the laws of any other jurisdiction before which this document may be presented, that I have signed this document as my own free act and that all of the foregoing is true and correct.

I hereby assent to the action already taken by the said ASSIGNEE in the above matter.

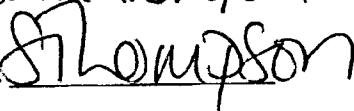
Signature (ASSIGNOR):



Dated: August 18th 2012

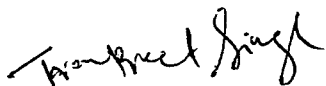
Name of witness: Sarah Thompson

Signature of witness:

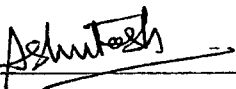


Acceptance by Assignee:

This is to memorialize that the foregoing assignment has been accepted by Glenmark Pharmaceuticals S.A.

Signature: 
Mr. Taranpreet Singh Lamba
General manager – IPM
Glenmark Pharmaceuticals Ltd.

Name of witness: **Mr. Ashutosh Bhargava**

Signature of witness: 

2

ASSIGNMENT

I, **Samuel HOU**, having an address c/o GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A., Chemin de la Combeta 5, 2300 La Chaux-de-Fonds, Switzerland (hereinafter called "ASSIGNOR") in consideration of the sum of One Dollar (\$1.00) or the equivalent thereof, and other good and valuable consideration, the sufficiency of which and receipt of which is hereby acknowledged, paid to me by

GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.

located at Chemin de la Combeta 5, 2300 La Chaux-de-Fonds, Switzerland (hereinafter called the "ASSIGNEE"), do hereby sell and assign to said ASSIGNEE, its successors and assigns, all my right, title and interest, throughout the world, including priority rights, in and to my Invention entitled:

"Antibodies that bind to OX40 and their uses"

invented by me, as a co-inventor, and described in the PCT application number **PCT/IB2012/053502** filed on **July 09, 2012** and/or improvements thereof and in all Letters Patents which may or shall be granted on said Invention, or any parts thereof, or on said application(s), or all national phase, divisions, continuations, continuation-in-parts, reissues, and extensions thereof and rights of priority therein, including the right to sue for past infringement and any such recovery, said interest being my entire ownership interest in said Letters Patent(s) when granted, to be held and enjoyed by said ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, to the full end of the term for which said Letters Patent(s) may be granted, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by me if this assignment and sale had not been made;

And I hereby agree to sign and execute any further documents or instruments which may be necessary, lawful, and proper in the prosecution of said above-named application(s) or in the preparation and prosecution of any national phase, divisional, continuing, continuation-in-part, substitute, renewal or reissue applications, or in any amendment, extension, or interference proceedings, or otherwise to secure the title thereto in said ASSIGNEE;

And I hereby authorize and request the Commissioner of Patents and Trademarks and any other granting authority to issue any Letters Patent resulting from said Invention and application(s) concerning same to said ASSIGNEE.

I declare under penalty of perjury under the laws of the United States of America and under penalty of the laws of any other jurisdiction before which this document may be presented, that I have signed this document as my own free act and that all of the foregoing is true and correct.

I hereby assent to the action already taken by the said ASSIGNEE in the above matter.

Signature (ASSIGNOR): Samuel Hou

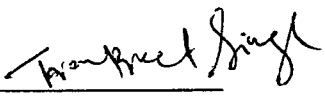
Dated: Aug 7th 2012

Name of witness: Sarah Thompson

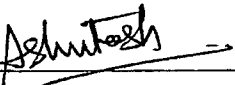
Signature of witness: S Thompson

Acceptance by Assignee:

This is to memorialize that the foregoing assignment has been accepted by Glenmark Pharmaceuticals S.A.

Signature: 
Mr. Taranpreet Singh Lamba
General manager – IPM
Glenmark Pharmaceuticals Ltd.

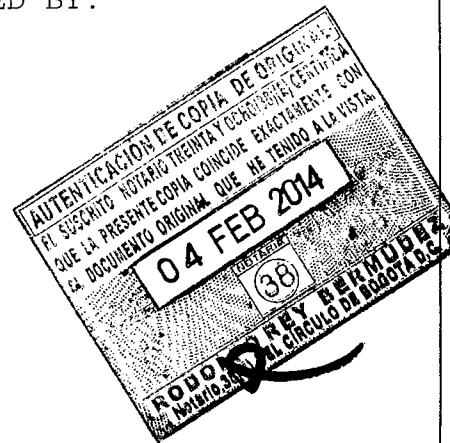
Name of witness: **Mr. Ashutosh Bhargava**

Signature of witness: 

APOSTILLE

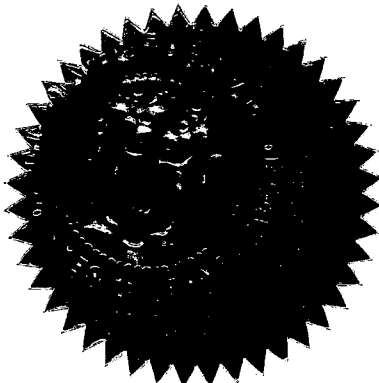
(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
KATHLEEN A DONOVAN
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
COUNTY CLERK
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
COUNTY OF BERGEN



CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 2ND DAY OF JULY 2007
7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A296133
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



Bradley Abelow

Castillo Grau & Associates

Law Offices
P.O. Box 251473
Bogotá, Colombia

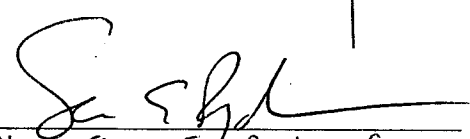
FOR PATENTS AND TRADEMARKS IN**COLOMBIA****PODER GENERAL****(1) GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.**

domiciliado en (2) Chemin de la Combeta 5, CH-2300 La Chaux-De-Fonds-Suiza

nombra al Dr. Germán Castillo Grau y/o Adriana Castillo Gibsone y/o Luis Felipe Castillo Gibsone

con oficinas en la Carrera 13 No. 37-43, Piso 12 en Bogotá, D.C., Colombia como sus representantes con poder especial amplio suficiente, para recabar de las oficinas autoridades Colombianas, administrativas judiciales o de policía, en primera o segunda instancia, la Obtención de Patentes de Invención, Registro de Marcas, de Diseños Industriales, de Nombres y Enseñas Comerciales, lo mismo que traspasos, extensiones, renovaciones, cambios de nombre y domicilio, registro de licencias de explotación y registro de licencias de uso referentes a tales actuaciones, a cuyo efecto les faculta para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos, solicitar la aplicación de medidas cautelares, aceptar en nuestro nombre y representación la Cesión de derechos de invención y de patente de invención que se nos haga por cualquier persona, abonar todos los impuestos cuotas y pagos determinados por la ley, recibir todos los documentos y valores dando el descargo respectivo, llenar cualesquiera otros requisitos, desistir, y tomar en fin todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses y en caso de presentarse oposiciones para que intervengan como demandantes o como demandados, con todas las demás facultades legales necesarias. Este poder comprende además las facultades de recibir, desistir, transigir, comprometer, sustituir, revocar sustituciones, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extra-judiciales

Dado y firmado en (4)
Ciudad de Mahwah, País de Bergen
Estado de New Jersey, Estados Unidos de América

Firma/Signature By: 

Name: Sean E. Ryder, Esq.

Title: Director of Intellectual Property

Corporate Seal to be Affixed

Director de Propiedad Intelectual

POWER OF ATTORNEY**(1) GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.**

domiciled in (2) Chemin de la Combeta 5, CH-2300 La Chaux-De-Fonds-Switzerland

hereby appoint Dr. Germán Castillo Grau and/or Adriana Castillo-Gibsone and/or Luis Felipe Castillo Gibsone

with offices at Carrera 13 No. 37-43, 12th Floor in Bogotá, Colombia, as our representatives with special ample and sufficient power to obtain from the offices and Colombian authorities, administrative, judicial and police, in first or in second instance, Patents of Invention, registration of Trade or Service Marks, Industrial Designs, of Commercial Names and Ensigns, as well as assignments, extensions, renewals, changes of names and addresses, registration of licences of exploitation and licences of use referring to said actions who are empowered to take before said authorities all of the necessary steps for the purposes indicated, to file applications, to formulate descriptions, corrections, protests, declarations, appeals and claims, apply for precautionary measures, to accept on our behalf and representation the assignment of rights on invention and titles of invention that may be given to us by any person, to pay all taxes, quotas and payments prescribed by law, to receive all the documents and proceeds giving the respective acquiescence or receipt, to fulfill any other requisites to desist and take in fact any other measures that may be deemed conducive to the safeguard of our interests, and in case oppositions are presented to intervene as plaintiff or defendant, with all necessary legal faculties. This power includes the faculties to receive, desist, compromise, transact, substitute it in all or in part, to revoke substitutions, to receive notifications and to appoint judicial or extra-judicial attorneys.

Given and signed in (4)
City of Mahwah, County of Bergen
State of New Jersey, United States of America

glenmark PHARMACEUTICALS S.A.
Chemin de la Combeta 5
CH-2300 La Chaux-de-Fonds
+41 (0)32 729 3550 - +41 (0)32 729 3560

DECLARACION NOTARIAL
(Individual)

A los 19 días del mes de Junio de 2007
compareció personalmente ante mí, Notario
Público el/la señor(a) Sean E. Ryder, Esq.

A quien(es) doy fé de conocer y me consta que
es(son) la(s) persona(s) descrita(s) y firmante(s)
del documento que precede, declarando ante mí
que otorga(n) el mismo para los fines y
propósitos que en él se expresan.

El Notario Público

(Sociedades)

El infrascrito Notario certifica: que la firma que
antecede y dice

SEAN E. RYDER, ESQ.
es auténtica; que el signatario desempeña el
cargo de

Director de Propiedad Intelectual
de **GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.**

que tiene facultad para otorgar este poder;

y que dicha compañía está domiciliada en

Chemin de la Combeta 5, CH-2300 La Chaux-
De-Fonds, Suiza

y actualmente existe y está organizada de
acuerdo a las leyes de Suiza

.....
Todos los hechos anteriores le constan por
haber examinado los documentos respectivos y
de todo ello da fe..

Dado y firmado en Ciudad de Mahwah,
País de Bergen, Estado de New Jersey,
Estados Unidos de América

El Notario Público
(Con Apostilla)

NOTARIAL CERTIFICATE
(Individuals)

On this 19th day of June of 2007
personally appeared before me, a Notary Public,
Sean E. Ryder, Esq.

to me known, and known to me be the person(s)
described in and who executed the foregoing
document, and he(they) duly acknowledged to
me that he(they) executed same for the uses
and purposes therein expressed.

Notary Public

(Corporations)

he undersigned Notary Public certifies: that
the preceding signature reading

Sean E. Ryder, Esq.
is authentic; that the signor at present fills the

Director of Intellectual Property
of **GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.**

and that he/she is empowered to grant this
power;

and that said company is domiciled in

Chemin de la Combeta 5, CH-2300 La Chaux-
De-Fonds, Switzerland

and actually exists and is organized in
accordance with the laws of Switzerland

All the foregoing facts are known to the Notary
due to his/her having examined the respective
documents to which he/she, the Notary, attests.

Granted and signed in City of Mahwah,
County of Bergen, State of New Jersey,
United States of America.


Notary Public
(With Apostille)

JENNIFER E. BYRNE
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires July 7, 2009

STATE OF NEW JERSEY,
COUNTY OF BERGEN} SS.:

I, Kathleen A. Donovan, Clerk of the County of Bergen
(the same being an office of Record of the aforesaid County,
having by law a seal)

DO HEREBY CERTIFY, That, Jennifer E. Byrne,
whose name is subscribed to the attached certificate of acknowledgement, proof or affidavit, was at the time of taking said
acknowledgement, proof or affidavit, a NOTARY PUBLIC, duly commissioned and sworn and residing in said State, and was, as such
NOTARY PUBLIC, an officer of said State duly authorized by the laws thereof to take and certify the same, as well as to take and certify
the proof and acknowledgement of deeds for the conveyance of land, tenements or hereditaments, and other instruments in writing to be
recorded in said State, and that the said acknowledgement is duly executed and taken according to the laws of said State, and that I am
well acquainted with his/her handwriting and verily believe the signature to the attached certificate is his/her genuine signature.

And I do further certify that the impression of the seal of such NOTARY PUBLIC is not required by the laws of this State to be
filed in my office.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed my official seal this

27th day of June A.D., 20 07

Kathleen A. Donovan

Clerk

Deputy



cb

✓

ANTICUERPOS QUE SE UNEN A OX40 Y SUS USOS

REFERENCIA RECÍPROCA A LA SOLICITUD RELACIONADA

5 Esta solicitud reclama el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos No. 61/506,491, presentada en Julio 11 de 2011, la cual se incorpora en su totalidad en la presente como referencia.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

10

La presente invención se refiere a anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen a OX40 de humano. Más específicamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una

15 CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y/o que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de

20 aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

OX40 es un miembro de la superfamilia de receptores del FNTR, y se identificó primero en 1987 como una glucoproteína de 50 kDa expresada en células T CD4+ activadas de la rata (Paterson DJ *et al.*, (1987) Mol. Immunol. 24: 1281-90). El dominio de unión a ligando extracelular de OX40 está compuesto de 3 dominios ricos en cisteína (CRDs) completos y un cuarto CDR C-terminal parcial (Bodmer JL *et al.*, (2002) Trends Biochem. Sci. 27: 19-26). El ligando para OX40 es OX40L (CD252), y 3 copias de OX40 se unen al ligando trimérico para formar el complejo OX40-OX40L (Compaan DM y Hymowitz SG (2006) Structure, 14: 1321-1330). OX40 es un receptor unido a la membrana; sin embargo, se ha detectado también una isoforma soluble (Taylor L y Schwarz H (2001) J. Immunol. Methods, 255: 67-72). A diferencia de CD28, OX40 no es expresado constitutivamente en células T no afectadas, sino es inducido después del engranaje del receptor de células T (TCR). OX40 es una molécula co-estimuladora secundaria, expresada después de 24 a 72 horas después de la activación; su ligando, OX40L, tampoco es expresado en células en reposo que presentan antígenos, pero es expresado después de su activación. OX40 es expresado principalmente por células T CD4+ activadas, y a un grado limitado, por células T CD8+ activadas (Salek-Ardakani S *et al.*, (2006) Curr. Immunol. Rev. 2: 37-53).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente descripción se refiere generalmente a anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen a OX40 de humano, métodos para su preparación y uso, incluyendo métodos para tratar trastornos mediados por OX40. Los anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos de la presente invención que se unen a OX40 de humano son anticuerpos antagonistas, y no muestran efectos agonistas y/o activan a OX40 de humano tras la unión.

10 En un aspecto, la presente descripción provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y/o una CDR3 de
15 cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y/o que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:
20 6.

En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que

2

4

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una región de estructura variable de cadena pesada que es el producto de o derivado de un gen de humano seleccionado del grupo que consiste de: IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19), IGHV2-70*01 (SEQ ID NO: 20), IGHV2-70*13 (SEQ ID NO: 21), IGHV2-5*09 (SEQ ID NO: 22) e IGHV2-70*11 (SEQ ID NO: 23).

En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, y en donde la región de estructura variable de cadena pesada comprende por lo menos una modificación de aminoácido de la región de estructura variable de cadena pesada correspondiente del anticuerpo de murino correspondiente.

En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una región de estructura variable de cadena ligera que es el producto de o derivado de un gen de humano seleccionado del grupo que consiste de: IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) e IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28).

5

En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que comprende una región de estructura variable de cadena ligera que es el producto de o derivado del gen de humano IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24), y en donde la región de estructura variable de
5 cadena ligera comprende por lo menos una modificación de aminoácido de la región de estructura correspondiente de la región variable de cadena ligera del anticuerpo de murino correspondiente.

En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que
10 comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38. En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 39, 40, 41, 42,
15 43, 44, 45, 46, 47, 48 y 49.

En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano, que comprende:

(a) una secuencia de cadena pesada que comprende la
20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 o 38; y

(b) una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47.

En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 58, 59, 79 y 80. En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 60, 86, 87 y 89.

10 En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 o 59; y

15 (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.

En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano, en donde el anticuerpo comprende una región Fc de IgG4 de humano, en donde el anticuerpo no tiene actividad de citotoxicidad mediada por Fc. En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano, en donde el anticuerpo comprende una región Fc de IGHG1 de humano, en donde el anticuerpo es competente

20

✓

4

para mecanismos de citotoxicidad tales como citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). En un aspecto preferido, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano tiene una región Fc de IGHG1 no fucosilada y exhibe mecanismos mejorados de citotoxicidad mediada por Fc tales como ADCC.

En otro aspecto, la descripción de la presente invención describe también anticuerpos humanizados antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen con una afinidad similar a OX40 de humano, ya que el anticuerpo quimérico correspondiente retiene, por ejemplo, por lo menos 75% de la afinidad de unión (K_D) a OX40 del anticuerpo quimérico correspondiente, o tiene afinidad de unión (K_D) a OX40 por lo menos equivalente o mayor cuando se compara con el anticuerpo quimérico correspondiente. En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a un epítipo dentro del segundo dominio de la región extracelular de OX40 de humano.

La descripción de la presente invención provee también ácidos nucleicos aislados que codifican para anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen a OX40 de humano, vectores y células hospederas que comprenden el ácido nucleico o el vector. Se proveen también composiciones que comprenden el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable e inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo enlazado a un agente terapéutico.

W

8

La presente descripción provee también métodos para tratar trastornos mediados por OX40. En un aspecto, en un modelo *in vitro* de activación y proliferación de células T alorreactivas (reacción mixta de linfocitos; MLR), un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo inhibe eficientemente la MLR en dos diferentes individuos (respondedores), con un valor de EC₅₀ de aproximadamente 100 ng/mL. Además, en una reacción de injerto xenogénico contra hospedero, un modelo para enfermedad de injerto alogénico contra hospedero (GVHD) observada después del trasplante de médula ósea en pacientes humanos, un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo suprimió potencialmente la reacción de GVHD.

La presente descripción provee también kits y artículos de fabricación que comprenden el anticuerpo o fragmentos del mismo, una composición o un inmunocombinado para el tratamiento de un trastorno mediado por OX40.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: (A) ELISA de unión directa en OX40-his recombinante inmovilizado de humano. La unión de los anticuerpos 2F8 y 1D4 quiméricos en OX40 de humano se midió mediante ELISA directa. Varias concentraciones (variando de 10 a 0.01mg/ml) de 1D4 (histogramas negros) y 2F8 (histogramas blancos) se incubaron con 2 mg/ml de proteína humana recombinante marcada con OX40-his recubierta durante la noche a 4°C en

26

8

una placa de 96 cavidades. La unión de cada anticuerpo a OX40 se detectó mediante un anticuerpo anti-humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). (B) ELISA competitiva en OX40-Fc recombinante inmovilizado de humano. Se evaluaron los efectos inhibidores de 1D4 y 2F8 quiméricos sobre la interacción OX40/OX40L mediante ELISA de bloqueo. Varias concentraciones (variando de 10 a 0.01 mg/ml) de 1D4 (histogramas negros) y 2F8 (histogramas blancos) se incubaron con 2 mg/ml de proteína humana recombinante marcada con OX40-Fc recubierta durante la noche a 4°C en una placa de 96 cavidades. Después de cinco minutos, una concentración fija de OX40L recombinante biotinilado de humano (0.04 mg/ml) se añadió a cada cavidad y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. La unión de OX40L a OX40 se detectó usando estreptavidina-HRP.

Figura 2: Reacción mixta de linfocitos (MLR) unidireccional medida mediante incorporación de timidina tritiada. Las barras muestran la incorporación media de timidina tritiada (conteos) de por lo menos triplicados $\pm$ error estándar de la media. Se muestran el control de isotipos (trastuzumab) y el control positivo (efalizumab). El efector representa sólo células efectoras. El efector más objetivo representan una medición en donde los anticuerpos se han omitido.

Figura 3: Análisis de citometría de flujo del anticuerpo 1D4 quimérico. (A) Tinción en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) activadas de humano y células HPB-ALL. Las gráficas del histograma muestran la intensidad de fluorescencia (eje X) y el número

relativo de células (% de eventos máximos – eje Y). Se indica el tipo de células teñidas. PBMCs de humano fueron activadas con PHA e IL-2 por 48 horas antes de las mediciones. (B) Tinción en PBMCs activadas de monos Cynomolgus. La unión del anticuerpo 1D4 quimérico a OX40 de monos Cynomolgus se evaluó mediante citometría de flujo. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de sangre entera colectada de un mono Cynomolgus, y 3×10^6 células se cultivaron por 50 horas en presencia de 10 mg/ml de PHA y 100 U/ml de rhIL-2. Se incubaron PBMCs activadas con 25 mg/ml de anticuerpo control (perfil superior (i)) o anticuerpo de OX40 anti-humano de oveja biotinilado (perfil medio (ii)) o anticuerpo 1D4 quimérico biotinilado (perfil inferior (iii)). La unión de cada anticuerpo a OX40 de los monos Cynomolgus se detectó con estreptavidina-APC.

Figura 4: Mediciones de los anticuerpos anti-OX40 con resonancia de plasmones de superficie. Los datos se expresan como número de respuesta (abreviado RU; eje Y) contra tiempo (eje X).

Figura 4A – anticuerpo VH1/VL1 contra quimera de 1D4.

Figura 4B – anticuerpos humanizados basados en VH1, VH2 y VH3 (como se indica) contra quimera de 1D4.

Figura 4C – ejemplos de enlazadores deficientes: VH4/VL4, VH5/VL4, VH5/VL5 y VH5/VL6.

Figura 4D – ejemplos de enlazadores débiles (VH5/VL9 y VH4/VL9) y buenos enlazadores (VH6/VL9 y VH7/VL9).

Figura 4E – anticuerpos humanizados basados en VH7.

Figura 4F – VH6/VL9 tiene mejores propiedades de unión sobre la quimera de 1D4 y la variante humanizada VH7/VL9.

Figura 5: Alineación de la secuencia. Alineación de la región variable de la cadena pesada (figura 5A) o cadena ligera (figura 5B) de 1D4 con estructuras seleccionadas de la línea germinal (IGHV 2-70*10 (SEQ ID NO: 19) e IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24)) de IMGT y variantes de la región variable con mutación retrógrada VH1 (SEQ ID NO: 29), VH2 (SEQ ID NO: 77), VH3 (SEQ ID NO: 78), VH4 (SEQ ID NO: 79), VH5 (SEQ ID NO: 80), VH6 (SEQ ID NO: 58), VH7 (SEQ ID NO: 59), VL1 (SEQ ID NO: 30), VL2 (SEQ ID NO: 81), VL3 (SEQ ID NO: 82), VL4 (SEQ ID NO: 83), VL5 (SEQ ID NO: 84), VL6 (SEQ ID NO: 85), VL7 (SEQ ID NO: 86), VL8 (SEQ ID NO: 87), VL9 (SEQ ID NO: 60), VL10 (SEQ ID NO: 88) y VL11 (SEQ ID NO: 89).

Figura 6: Mediciones de termoestabilidad del fragmento FAB del anticuerpo VH6/VL9 anti-OX40 humanizado usando calorimetría de barrido diferencial. Los datos se expresan como el exceso de la capacidad térmica molar (abreviada como Cp [kcal/mol/°C]; eje Y) contra temperatura (eje X).

Figura 7: Caracterización de epítopes. Esta figura muestra el epítipo del anticuerpo VH6/VL9 anti-OX40 humanizado basado en los resultados de la prueba de ELISA como se describe en el ejemplo 7.

Figura 8: Reacción mixta de linfocitos (MLR) medida mediante la incorporación de timidina tritiada. Las figuras 8A y 8B muestran los resultados de la reacción mixta de linfocitos a partir de dos donadores no emparentados. Se midió la proliferación mediante la incorporación de timidina tritiada. La

gráfica muestra los valores absolutos del conteo para cada condición $\pm$ SEM. Las células respondedoras fueron PBMCs no tratadas, y las células estimuladoras fueron PBMCs tratadas con mitomicina. Todas las condiciones con los anticuerpos de prueba se hicieron con células respondedoras
5 mezcladas con PBMCs estimuladoras heterólogas. El control positivo fue Efalizumab (anticuerpo anti-LFA-1).

Figura 9: Modelo de la reacción de injerto xenogénico contra hospedero. Esta figura muestra el por ciento de supervivencia dentro de los grupos de ocho animales para cada condición mencionada. Vehículo: sólo
10 PBS. La línea de puntos vertical indica el último día de tratamiento. No se observaron ni mortalidad ni síntomas en un grupo de dos animales control irradiados que no recibieron PBMCs (no mostrado).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15

La presente descripción se refiere a anticuerpos antagonistas y fragmentos de los mismos que se unen a OX40 de humano.

El término "OX40 de humano", como se usa en la presente, incluye variantes, isoformas y homólogos de especie de OX40 de humano.
20 Por consiguiente, los anticuerpos de esta descripción pueden reaccionar en forma cruzada, en ciertos casos, con OX40 de especies diferentes de la especie humana. En ciertas modalidades, los anticuerpos pueden ser completamente específicos para una o más proteínas OX40 de humano, y

pueden no exhibir reactividad cruzada con especies u otros tipos de especies no humanas. La secuencia de aminoácidos completa de un ejemplo de OX40 de humano tiene el número de acceso de Swiss-Prot P43489 (TNFR4_HUMANO; SEQ ID NO: 12). OX40 se conoce también como CD134, 5 TNFRSF4, ACT35 o TXGP1 L. OX40 de humano se designa como GenelD: 7293 por Entrez Gene, y HGNC: 11918 por HGNC. OX40 se ha designado también como CD134 (grupo de diferenciación 134). OX40 puede ser codificada por el gen designado como TNFRSF4/OX40.

El uso del término "OX40 de humano" abarca en la presente 10 todos los alelos y formas polimórficas conocidos o aún no descubiertos de OX40 de humano. Los términos "OX40 de humano", "OX40" o "receptor de OX40" se usan equivalentemente en la presente, y significan "OX40 de humano", si no se indica específicamente de otra manera.

Los términos "ligando de OX40" u "OX40L" se usan 15 equivalentemente en la presente, e incluyen al ligando de OX40, específicamente el ligando de OX40 de humano. OX40L es un miembro de la superfamilia del FNT, y se conoce también como gp34 o CD252. OX40L se ha designado también como CD252 (grupo de diferenciación 252), y tiene el número de acceso de la base de datos de secuencia P23510 (Swiss-Prot) o 20 Q6FGS4 (Uniprot). OX40L se expresa sobre la superficie de células B activadas, células T, células dendríticas y células endoteliales.

El término "anticuerpo o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano", como se usa en la presente, incluye anticuerpos o un

fragmento de los mismos que se unen a OX40 de humano, por ejemplo, OX40 de humano en forma aislada, con una afinidad (K_D) de 500 nM o menos, de preferencia 200 nM o menos, más preferiblemente 150 nM o menos, más preferiblemente 120 nM o menos, aún más preferiblemente 110 nM o menos.

- 5 El término "anticuerpo o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano" incluye anticuerpos o fragmentos de unión antigénicos de los mismos.

Los términos "anticuerpo antagonístico" o "anticuerpo antagonista" se usan equivalentemente en la presente, e incluyen un anticuerpo que es capaz de inhibir y/o neutralizar la actividad de señalización biológica de OX40, por ejemplo, bloqueando la unión o sustancialmente reduciendo la unión de OX40 al ligando de OX40, y de esta manera inhibiendo o reduciendo la vía de señalización desencadenada por OX40 y/o inhibiendo o reduciendo una respuesta de las células mediada por OX40 tal como proliferación de linfocitos, expresión de citocinas o supervivencia de linfocitos.

- 15 El término "anticuerpo", como es referido en la presente, incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión a antígeno o cadena sencilla de los mismos. Un "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región
- 20

3^a

variable de cadena ligera (abreviada en la presente como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs), las cuales son hipervariables en secuencia y/o están implicadas en el reconocimiento del antígeno y/o forman usualmente bucles estructuralmente definidos, entremezcladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de estructura (FR o FW). Cada VH y VL está compuesta de tres CDRs y cuatro FWs, dispuestas del extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. Todas las secuencias de aminoácidos de FW1, FW2, FW3, y FW4 constituyen un conjunto la “región no de CDR” o “región de CDR no extendida” de VH o VL, como es referido en la presente.

El término “región de estructura variable de cadena pesada”, como es referido en la presente, puede comprender una o más (por ejemplo, una, dos, tres y/o cuatro) secuencias de la región de estructura de cadena pesada (por ejemplo, estructura 1 (FW1), estructura 2 (FW2), estructura 3 (FW3) y/o estructura 4 (FW4)). De preferencia, la región de estructura variable de cadena pesada comprende FW1, FW2 y/o FW3, más preferiblemente FW1, FW2 y FW3. El término “región de estructura variable de cadena ligera”, como es referido en la presente, puede comprender una o más (por ejemplo, una, dos, tres y/o cuatro) secuencias de la región de estructura de cadena ligera (por ejemplo, estructura 1 (FW1), estructura 2 (FW2), estructura 3 (FW3) y/o

estructura 4 (FW4)). De preferencia, la región de estructura variable de cadena ligera comprende FW1, FW2 y/o FW3, más preferiblemente FW1, FW2 y FW3.

Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedero, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complementos clásico.

Los anticuerpos se agrupan en clases, referidas también como isotipos, como es determinado genéticamente por la región constante. Las cadenas ligeras constantes de humano se clasifican como cadenas ligeras kappa (CK) y lambda (Cλ). Las cadenas pesadas se clasifican como mu (μ), delta (δ), gamma (γ), alfa (α) o épsilon (ε), y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. De esta manera, el término “isotipo”, como se usa en la presente, significa cualquiera de las clases y/o subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulina conocidos de humano son IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD) e IgE (IGHE). El denominado gen de pseudo-gamma IGHGP de inmunoglobulina de humano representa un gen de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de humano adicional que ha sido secuenciado, pero no

34

17

codifica para una proteína debido a una región de conmutación alterada (Bensmana M *et al.*, (1988) Nucleic Acids Res. 16(7): 3108). A pesar de que tiene una región de conmutación alterada, el gen de pseudo-gamma IGHGP de inmunoglobulina de humano tiene marcos de lectura abiertos para todos los dominios constantes de cadena pesada (CH1-CH3) y gozne. Todos los marcos de lectura abiertos para sus dominios constantes de cadena pesada codifican para dominios de proteína que se alinean bien con todos los dominios constantes de inmunoglobulina de humano con las características estructurales predichas. Este isotipo pseudo-gamma adicional es referido en la presente como IgGP o IGHGP. Se han reportado otros genes de pseudo-inmunoglobulina, tales como los pseudo-genes épsilon P1 y P2 del dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina de humano (IGHEP1 e IGHEP2). La clase de IgG es la usada más comúnmente para propósitos terapéuticos. En humanos, esta clase comprende las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En ratones, esta clase comprende las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3.

El término "anticuerpo quimérico", como se usa en la presente, incluye anticuerpos en los cuales las secuencias de la región variable se derivan de una especie y las secuencias de la región constante se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el cual las secuencias de la región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante se derivan de un anticuerpo de humano.

El término "anticuerpo humanizado" o "anticuerpo anti-OX40 humanizado", como se usa en la presente, incluye anticuerpos en los cuales las secuencias de la CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, han sido injertadas en secuencias de estructura de humano. Pueden hacerse modificaciones adicionales a la región de estructura dentro de las secuencias de estructura de humano, así como dentro de las secuencias de la CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero.

El término "Fab" o "región Fab", como se usa en la presente, incluye los polipéptidos que comprenden los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, VL y CL. El término Fab puede referirse a esta región en aislamiento, o esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa o fragmento de anticuerpo.

El término "Fc" o "región Fc", como se usa en la presente, incluye el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo, excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante. De esta manera, la región Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgA, IgD e IgG, y los tres últimos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgE e IgM, y el gozne flexible N-terminal para estos dominios. Para la IgA y la IgM, la región Fc puede incluir la cadena J. Para la IgG, la región Fc comprende los dominios de inmunoglobulina C gamma 2 y C gamma 3 (C γ 2 y C γ 3) y el gozne entre C gamma 1 (G γ 1) y C gamma 2 (C γ 2). Aunque los límites de la región Fc

pueden variar, se define usualmente que la región Fc de la cadena pesada de IgG de humano comprende los residuos C226 o P230 hacia su extremo carboxilo, en donde la numeración es de acuerdo con el sistema de numeración de EU. Para la IgG1 de humano, se define en la presente que la
5 región Fc comprende el residuo P232 hacia su extremo carboxilo, en donde la numeración es de acuerdo con el sistema de numeración de EU (Edelman GM *et al.*, (1969) Proc Natl Acad Sci USA, 63(1): 78-85). La región Fc puede referirse a esta región en aislamiento o esta región en el contexto de un polipéptido de Fc, por ejemplo, un anticuerpo.

10 El término “gozne” o “región de gozne” o “región de gozne del anticuerpo”, incluye en la presente el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer y segundo dominios constantes de un anticuerpo. La “región de gozne”, como es referida en la presente, es una región de secuencia de 6 a 62 aminoácidos de longitud, sólo presentes en la IgA, la IgD
15 y la IgG, la cual abarca los residuos de cisteína que unen con un puente las dos cadenas pesadas. Estructuralmente, el dominio CH1 de la IgG termina en la posición de EU 220, y el dominio CH2 de la IgG comienza en la posición de EU 237. De esta manera, para la IgG, se define en la presente que el gozne del anticuerpo incluye las posiciones 221 (D221 en la IgG1) a 231 (A231 en la
20 IgG1), en donde la numeración es de acuerdo con el sistema de numeración de EU (Edelman GM *et al.*, citado anteriormente).

El término “anticuerpo precursor” o “inmunoglobulina precursora”, como se usa en la presente, incluye un anticuerpo no modificado que es

modificado posteriormente para generar una variante. Dicho anticuerpo precursor puede ser un anticuerpo de ocurrencia natural, o una versión variante o diseñada de un anticuerpo de ocurrencia natural. El anticuerpo precursor puede referirse al anticuerpo mismo, composiciones que comprenden el anticuerpo precursor, o la secuencia de aminoácidos que codifica. Por el término "anticuerpo anti-OX40 precursor", como se usa en la presente, se entiende un anticuerpo o inmunoglobulina que se une a OX40 de humano y es modificado para generar una variante. Por el término "anticuerpo de murino correspondiente", como se usa en la presente, se entiende un anticuerpo o inmunoglobulina de murino que se une a OX40 de humano, y puede ser modificado para generar una variante, específicamente el anticuerpo 1D4 de murino como se describe en la presente.

El término "anticuerpo variante" o "variante de anticuerpo", como se usa en la presente, incluye una secuencia de anticuerpo que difiere de aquella de una secuencia de anticuerpo precursor en virtud de por lo menos una modificación de aminoácido en comparación con el precursor. La secuencia de anticuerpo variante poseerá de preferencia en la presente por lo menos aproximadamente 80%, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 90%, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de anticuerpo precursor. La variante de anticuerpo puede referirse al anticuerpo mismo, composiciones que comprenden la variante de anticuerpo, o la secuencia de aminoácidos que codifica.

El término "modificación de aminoácido" incluye en la presente una sustitución, inserción y/o delección de aminoácido en una secuencia de polipéptidos. Por el término "sustitución de aminoácido" o "sustitución", se entiende en la presente el reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido precursor con otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución R94K se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante de la región de estructura variable de cadena pesada, en la cual la arginina en la posición 94 es reemplazada con una lisina. Para el ejemplo anterior, 94K indica la sustitución en la posición 94 con una lisina. Para los propósitos en la presente, las sustituciones múltiples se separan típicamente mediante una diagonal. Por ejemplo, R94K/L78V se refiere a una variante doble que comprende las sustituciones R94K y L78V. Por el término "inserción de aminoácido" o "inserción", como se usa en la presente, se entiende la adición de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptidos precursora. Por ejemplo, la inserción -94 designa una inserción en la posición 94. Por el término "delección de aminoácido" o "delección", como se usa en la presente, se entiende la remoción de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptidos precursora. Por ejemplo, R94- designa la delección de arginina en la posición 94.

Como se usa en la presente, se pretende que el término "modificaciones conservativas" o "modificaciones conservativas de secuencia" se refiera a modificaciones de aminoácidos que no afecten o alteren significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene a la

secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservativas incluyen sustituciones, inserciones y deleciones de aminoácido. Pueden introducirse modificaciones en un anticuerpo de la invención mediante técnicas estándar conocidas en la materia, tales como mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservativas de aminoácido son aquellas en las cuales el residuo de aminoácido es reemplazado con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares se han definido 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 no cargadas (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). De esta manera, uno o más residuos de aminoácido dentro de las regiones CDR o dentro de las regiones de estructura de un anticuerpo de la invención pueden ser reemplazados con otros residuos de aminoácido de la misma familia de la cadena lateral, y el anticuerpo alterado (anticuerpo variante) puede ser puesto a prueba para función retenida.

Para todos los dominios constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina de humano la numeración es de acuerdo con el "sistema de

numeración de EU" (Edelman GM *et al.*, (1969) Proc Natl Acad Sci USA, 63(1): 78-85). Para el dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina kappa de humano (IGKC), la numeración es de acuerdo con el "sistema de numeración de EU" (Edelman GM *et al.*, citado anteriormente).

5 Para los dominios constantes de la cadena ligera de inmunoglobulina lambda de humano (IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6 e IGLC7), la numeración es de acuerdo con el "sistema de numeración de Kabat" (Kabat EA *et al.*, (1991) Sequences of proteins of immunological interest. 5a. edición - US Department of Health and Human Services, NIH, publicación No. 91-10 3242), como es descrito por Dariavach P *et al.*, (1987) Proc Natl Acad Sci USA, 84(24): 9074-8 y Frangione B *et al.*, (1985) Proc Natl Acad Sci USA, 82(10): 3415-9.

El término "dominio variable" se refiere a los dominios que median la unión al antígeno y definen la especificidad de un anticuerpo particular por un antígeno particular. En anticuerpos de ocurrencia natural, el sitio de unión al antígeno consiste de dos dominios variables que definen la especificidad: uno localizado en la cadena pesada (VH) y el otro localizado en la cadena ligera (VL). En algunos casos, la especificidad puede residir exclusivamente en sólo uno de los dos dominios como en los anticuerpos de dominio sencillo de los anticuerpos de cadena pesada encontrados en los camélidos. Las regiones V son usualmente de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud, y consisten de tramos relativamente invariantes de secuencia de aminoácidos denominados regiones de estructura (FRs) de 15 a

30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que son de 9 a 12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cuatro FRs, adoptando principalmente una configuración de lámina beta, unidas por tres regiones hipervariables, las cuales forman bucles. Las regiones hipervariables en cada cadena son mantenidas juntas en estrecha proximidad por las FRs, y con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat EA *et al.*, citado anteriormente). El término "región hipervariable", como se usa en la presente, se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende generalmente residuos de aminoácido de una "región determinante de complementariedad" o "CDR", la última siendo de más alta variabilidad de secuencia y/o implicada en el reconocimiento del antígeno. Para todos los dominios variables, la numeración es de acuerdo con Kabat (Kabat EA *et al.*, citado anteriormente).

Muchas definiciones de la CDR están en uso y son abarcadas en la presente. La definición de Kabat se basa en la variabilidad de la secuencia y es la usada más comúnmente (Kabat EA *et al.*, citado anteriormente). Chothia se refiere más bien a la localización de los bucles estructurales (Chothia C y Lesk AM (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917). La definición de AbM es un compromiso entre las definiciones de Kabat y Chothia, y es usada por el software de modelación de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (Martin ACR

et al., (1989) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86: 9268-72; Martin ACR *et al.*, (1991) *Methods Enzymol.* 203: 121-153; Pedersen JT *et al.*, (1992) *Immunomethods*, 1: 126-136; Rees AR *et al.*, (1996) en Sternberg M. J. E. (ed.), *Protein Structure Prediction*. Oxford University Press, Oxford, 141-172). La definición del contacto se ha introducido recientemente (MacCallum RM *et al.*, (1996) *J. Mol. Biol.* 262: 732-745), y se basa en un análisis de las estructuras complejas disponibles en el Banco de Datos de Proteínas. La definición de la CDR por IMGT®, sistema de información internacional ImMunoGeneTics® (<http://www.imgt.org>), se basa en la numeración de IMGT para todas las regiones V de los receptores de células T y de inmunoglobulina de todas las especies (IMGT®, sistema de información internacional ImMunoGeneTics®; Lefranc MP *et al.*, (1991) *Nucleic Acids Res.* 27(1): 209-12; Ruiz M *et al.*, (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1): 219-21; Lefranc MP (2001) *Nucleic Acids Res.* 29(1): 207-9; Lefranc MP (2003) *Nucleic Acids Res.* 31(1): 307-10; Lefranc MP *et al.*, (2005) *Dev. Comp. Immunol.* 29(3): 185-203; Kaas Q *et al.*, (2007) *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 6(4): 253-64).

Todas las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) discutidas en la presente invención se definen de preferencia de acuerdo con IMGT®. Los residuos del dominio variable para cada una de estas CDRs, son los siguientes (numeración de acuerdo con Kabat EA, *et al.*, citado anteriormente): LCDR1: 27-32, LCDR2: 50-52, LCDR3: 89-97, HCDR1: 26-35, HCDR2: 51-57 y HCDR3: 93-102. La "región no de CDR" de la región VL, como se usa en la presente, comprende las secuencias de aminoácidos: 1-26

(FR1), 33-49 (FR2), 53-88 (FR3) y 98- aproximadamente 107 (FR4). La "región no de CDR" de la región VH, como se usa en la presente, comprende las secuencias de aminoácidos: 1-25 (FR1), 36-50 (FR2), 58-92 (FR3) y 103- aproximadamente 113 (FR4).

5 Las CDRs de la presente invención pueden comprender "CDRs extendidas", las cuales se basan en las definiciones mencionadas anteriormente, y tienen residuos del dominio variable siguientes: LCDR1: 24-36, LCDR2: 46-56, LCDR3: 89-97, HCDR1: 26-36, HCDR2: 47-65, HCDR3: 93-102. Estas CDRs extendidas se enumeran también de acuerdo con Kabat
10 *et al.*, citado anteriormente. La "región de CDR no extendida" de la región VL, como se usa en la presente, comprende las secuencias de aminoácidos: 1-23 (FR1), 37-45 (FR2), 57-88 (FR3) y 98- aproximadamente 107 (FR4). La "región de CDR no extendida" de la región VH, como se usa en la presente, comprende las secuencias de aminoácidos: 1-25 (FR1), 37-46 (FR2), 66-92
15 (FR3) y 103- aproximadamente 113 (FR4).

El término "anticuerpo de longitud completa", como se usa en la presente, incluye la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluyendo las regiones variables y constantes. Por ejemplo, en la mayoría de los mamíferos, incluyendo humanos y ratones, el anticuerpo de
20 longitud completa de la clase de IgG es un tetrámero y consiste de dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulina, cada par teniendo una cadena ligera y una cadena pesada, cada cadena ligera comprendiendo los dominios de inmunoglobulina VL y CL, y cada cadena pesada comprendiendo los

dominios de inmunoglobulina VH, CH1 (C γ 1), CH2 (C γ 2) y CH3 (C γ 3). En algunos mamíferos, por ejemplo, en camellos y llamas, los anticuerpos de IgG pueden consistir de sólo dos cadenas pesadas, cada cadena pesada comprendiendo un dominio variable unido a la región Fc.

- 5 Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no están limitados a, (i) el fragmento Fab que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH1, incluyendo Fab' y Fab'-SH, (ii) el fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un anticuerpo sencillo, (iv) el fragmento dAb (Ward ES *et al.*, (1989) *Nature*, 341: 10 544-546) que consiste de un dominio sencillo variable, (v) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados, (vi) moléculas de Fv de cadena sencilla (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL están enlazados por un enlazador de péptidos que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird RE *et al.*, (1988) *Science* 242: 423-426; Huston JS *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-83), (vii) dímeros de Fv de cadena sencilla biespecíficos (documento PCT/US92/09965), (viii) "cuerpos bivalentes" o "cuerpos 15 trivalentes", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos mediante la fusión de genes (Tomlinson I y Hollinger P (2000) *Methods Enzymol.* 326: 20 461-79; documento WO94/13804; Hollinger P *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-48) y (ix) scFv fusionado genéticamente con el mismo anticuerpo o un anticuerpo diferente (Coloma MJ y Morrison SL (1997) *Nature Biotechnology*, 15(2): 159-163).

El término "función efectora", como se usa en la presente, incluye un evento bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc del anticuerpo con un receptor o ligando de la región Fc. Las funciones efectoras incluyen funciones efectoras mediadas por FcγR, tales como ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo) y ADCP (fagocitosis mediada por células dependiente del anticuerpo) y funciones efectoras mediadas por el complemento, tales como CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). Una función efectora de un anticuerpo puede ser alterada alterando, es decir, aumentando o reduciendo, de preferencia aumentando, la afinidad del anticuerpo por una molécula efectora tal como un receptor de Fc o un componente del complemento. La afinidad de unión se hará variar generalmente modificando el sitio de unión de la molécula efectora, y en este caso es apropiado localizar el sitio de interés y modificar por lo menos parte del sitio en una manera adecuada. Se contempla también que una alteración en el sitio de unión en el anticuerpo para la molécula efectora no necesita alterar significativamente la afinidad de unión general, sino puede alterar la geometría de la interacción, haciendo que el mecanismo efector sea ineficaz como en la unión no productiva. Se contempla además que una función efectora pueda ser alterada también modificando un sitio no directamente implicado en la unión a la molécula efectora, sino de otra manera implicado en el desempeño de la función efectora. Mediante la alteración de una función efectora de un anticuerpo, puede ser posible controlar varios aspectos de la respuesta inmune, por ejemplo, aumentando o

suprimiendo varias reacciones del sistema inmune, con efectos benéficos posibles en diagnóstico y terapia.

Como se usa en la presente, el término "trastorno mediado por OX40" incluye condiciones tales como alergia, asma, EPOC, artritis reumatoide, psoriasis y enfermedades asociadas con autoinmunidad e inflamación.

Como se usa en la presente, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye a todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc. De preferencia, el sujeto es humano.

Anticuerpos anti-OX40

En un primer aspecto, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y/o que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y/o una CDR3

de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano comprende una CDR1 de cadena pesada extendida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y/o una CDR2 de cadena pesada extendida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y/o una CDR3 de cadena pesada extendida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y/o comprende una CDR1 de cadena ligera extendida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, y/o una CDR2 de cadena ligera extendida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y/o una CDR3 de cadena ligera extendida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

De preferencia, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y/o una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. Más preferiblemente, el anticuerpo antagonista o fragmento del

mismo que se une a OX40 de humano comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

Es bien sabido en la técnica que el dominio de la CDR3 solo, independientemente de los dominios de la CDR1 y/o la CDR2, puede determinar la especificidad de unión de un anticuerpo por un antígeno cognado, y que pueden generarse predeciblemente anticuerpos múltiples que tienen la misma especificidad de unión con base en una secuencia común de la CDR3. Véase, por ejemplo, Klimka A *et al.*, (2000) Br. J. Cancer, 83(2): 252-260 (que describe la producción de un anticuerpo anti-CD30 humanizado usando sólo la CDR3 del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD30 de murino, Ki-4); Beiboer SH *et al.*, (2000) J. Mol. Biol. 296: 833-849 (que describe anticuerpos de la glucoproteína-2 epitelial recombinante (EGP-2) usando sólo la secuencia de la CDR3 de cadena pesada del anticuerpo anti-EGP-2 MOC-31 precursor de murino); Rader C *et al.*, (1998) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95: 8910-8915 (que describe un panel de anticuerpos anti-integrina $\alpha\beta 3$ humanizados usando un dominio de la CDR3

variable de cadena ligera y pesada de un anticuerpo anti-integrina $\alpha v \beta 3$ de murino, LM609, en donde cada anticuerpo miembro comprende una secuencia distinta fuera del dominio de la CDR3 y capaz de unirse al mismo epítotope que el anticuerpo de murino precursor con afinidades tan altas o
5 mayores que el anticuerpo de murino precursor); y Barbas C *et al.*, (1994) J. Am. Chem. Soc. 116: 2161-62 (que describe que el dominio de la CDR3 provee la contribución más significativa a la unión al antígeno).

Por consiguiente, la presente invención provee anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen a OX40 de humano que comprenden
10 uno o más dominios de la CDR3 de cadena ligera y/o pesada, en particular que comprenden la CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y/o la CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, en donde el anticuerpo es capaz de unirse a OX40 de humano. Dentro de algunas modalidades, dichos
15 anticuerpos inventivos que comprenden uno o más dominios de la CDR3 de cadena ligera y/o pesada de un anticuerpo no de humano, (a) son capaces de competir por la unión con OX40; (b) retienen las características funcionales; (c) se unen al mismo epítotope; y/o (d) tienen una afinidad de unión similar que el anticuerpo no de humano precursor correspondiente, por ejemplo,
20 anticuerpo de murino.

En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto, la presente invención provee variantes de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano. De esta manera, la presente invención provee anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen una secuencia de aminoácidos de las regiones no de CDR de la secuencia de la región variable de la cadena pesada y/o ligera que es por lo menos 80% idéntica (teniendo por lo menos 80% de identidad de secuencia de aminoácidos) a la secuencia de aminoácidos de las regiones no de CDR de la secuencia de la región variable de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo antagonista precursor de la cadena pesada o la cadena ligera, por ejemplo, de las secuencias de la región variable de la cadena ligera y pesada como en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, respectivamente. También anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen una secuencia de aminoácidos de las regiones de CDR no extendidas de la secuencia de la región variable de la cadena pesada y/o ligera que es

por lo menos 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de las regiones de CDR no extendidas de la secuencia de la región variable de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo antagonista precursor de la cadena pesada o la cadena ligera, son provistos por la presente invención. De preferencia, la

5 identidad de la secuencia de aminoácidos de las regiones no de CDR o de las regiones de CDR no extendidas de la secuencia de la región variable de la cadena pesada y/o ligera es de por lo menos 85%, más preferiblemente por lo menos 90%, y muy preferiblemente por lo menos 95%, en particular 96%, más en particular 97%, aun más en particular 98%, muy en particular 99%,

10 incluyendo por ejemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y 100%. La identidad u homología con respecto a una secuencia de aminoácidos se define en la presente como el porcentaje de residuos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos con el anticuerpo antagonista o

15 fragmento del mismo que se une a OX40 de humano, después de la alineación de las secuencias e introduciendo espacios intermedios, si es necesario, para lograr el por ciento máximo de identidad de secuencia. De esta manera, la identidad de secuencia puede determinarse mediante métodos estándar que se usan comúnmente para comparar la similitud en la

20 posición de los aminoácidos de dos polipéptidos. Mediante el uso de un programa de cómputo tal como BLAST o FASTA, dos polipéptidos son alineados para coincidencia óptima de sus aminoácidos respectivos (ya sea a lo largo de la longitud completa de una secuencia o ambas secuencias, o a lo

largo de una porción predeterminada de una secuencia o ambas secuencias). Los programas proveen una penalización por apertura predeterminada y una penalización por espacios intermedios predeterminada, y una matriz de puntuación tal como PAM250 (una matriz de puntuación estándar; véase

5 Dayhoff MO *et al.*, (1978) en Atlas of Protein Sequence and Structure, vol 5, supl. 3) puede usarse en conjunto con el programa de cómputo. Por ejemplo, el por ciento de identidad puede calcularse como: el número total de coincidencias idénticas multiplicado por 100, y dividido entonces entre la suma de la longitud de la secuencia más larga dentro del tramo comparado y el

10 número de espacios intermedios introducidos en las secuencias más largas para alinear las dos secuencias.

En algunas modalidades, la presente descripción provee de esta manera un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una

15 secuencia de región de estructura variable de cadena pesada que es por lo menos 70% idéntica a la secuencia de la región de estructura de SEQ ID NOS: 19, 20, 21, 22 o 23 y/o una secuencia de región de estructura variable de cadena ligera que es por lo menos 60% idéntica a la secuencia de la región de estructura de SEQ ID NOS: 24, 25, 26, 27 y 28. En algunas modalidades,

20 la presente descripción provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de región de estructura variable de cadena pesada que es por lo menos 74% idéntica a la secuencia de la región

de estructura de SEQ ID NO: 19 y/o una secuencia de región de estructura variable de cadena ligera que es por lo menos 65% idéntica a la secuencia de la región de estructura de SEQ ID NO: 24.

En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo

5 antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende las CDRs de cadena pesada y/o ligera como se describió anteriormente y que comprende además una región de estructura variable de cadena pesada que es el producto de o derivado de un gen de humano seleccionado del grupo que consiste de IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19),

10 IGHV2-70*01 (SEQ ID NO: 20), IGHV2-70*13 (SEQ ID NO: 21), IGHV2-5*09 (SEQ ID NO: 22) e IGHV2-70*11 (SEQ ID NO: 23), de preferencia una región de estructura variable de cadena pesada que es el producto de o derivado del gen de humano IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19). La región de estructura variable de cadena pesada puede comprender una o más (por ejemplo, una,

15 dos, tres y/o cuatro) secuencias de la región de estructura de cadena pesada (por ejemplo, estructura 1 (FW1), estructura 2 (FW2), estructura 3 (FW3) y/o estructura 4 (FW4)) presentes en el producto de o derivado de aquellos genes de humano. De preferencia, la región de estructura variable de cadena pesada comprende FW1, FW2 y/o FW3, más preferiblemente FW1, FW2 y FW3

20 presentes en el producto de o derivado de un gen de humano seleccionado del grupo que consiste de IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19), IGHV2-70*01 (SEQ ID NO: 20), IGHV2-70*13 (SEQ ID NO: 21), IGHV2-5*09 (SEQ ID NO: 22) e IGHV2-70*11 (SEQ ID NO: 23). Las secuencias de la región de estructura de

cadena pesada, como se usan en la presente, incluyen FW1 (posición 1 a posición 25), FW2 (posición 36 a posición 49), FW3 (posición 66 a posición 94) y FW4 (posición 103 a posición 113), en donde la posición de aminoácido se indica usando el sistema de numeración expuesto en Kabat.

5 En algunas modalidades, la presente descripción provee un anticuerpo o fragmento del mismo, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región de estructura variable de cadena pesada que es el producto de o derivado del gen de humano IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19), y en donde la región de estructura variable de cadena pesada comprende por
10 lo menos una modificación de aminoácido de la región de estructura variable de cadena pesada correspondiente del anticuerpo de murino correspondiente.

En algunas modalidades, la presente descripción provee un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, y en
15 donde la región de estructura variable de cadena pesada comprende por lo menos una modificación de aminoácido de la región de estructura variable de cadena pesada correspondiente del anticuerpo de murino correspondiente.

De preferencia, la modificación de aminoácido comprende una sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido seleccionada del
20 grupo que consiste de 23, 35b, 48, 50, 60 y 62, más preferiblemente en las posiciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste de 23, 35b, 50, 60 y 62, muy preferiblemente en la posición de aminoácido 35b, en donde la posición de aminoácido de cada miembro de grupo se indica de acuerdo

con la numeración de Kabat. Específicamente, la modificación de aminoácido comprende una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de 23S, 35bG, 48L, 50H, 60N y 62A, de preferencia una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de T23S, S35bG, I48L, 5 R50H, S60N y S62A, mientras que S35bG es la sustitución de aminoácido más preferida, en donde la posición de aminoácido de cada miembro de grupo se indica de acuerdo con la numeración de Kabat.

En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que
10 comprende una región de estructura variable de cadena ligera que es el producto de o derivado de un gen de humano seleccionado del grupo que consiste de IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) e IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28), de preferencia una región de estructura variable de
15 cadena ligera que es el producto de o derivado del gen de humano IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24). La región de estructura variable de cadena ligera puede comprender una o más (por ejemplo, una, dos, tres y/o cuatro) secuencias de la región de estructura de cadena ligera (por ejemplo, estructura 1 (FW1), estructura 2 (FW2), estructura 3 (FW3) y/o estructura 4
20 (FW4)) presentes en el producto de o derivado de aquellos genes de humano. De preferencia, la región de estructura variable de cadena ligera comprende FW1, FW2 y/o FW3, más preferiblemente FW1, FW2 y FW3, presente en el producto de o derivado de un gen de humano seleccionado del grupo que

56

consiste de V3-11*01 (SEQ ID NO: 24), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) e IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28). Las secuencias de la región de estructura de cadena ligera, como se usan en la presente, incluyen FW1 (posición 1 a posición 23),
5 FW2 (posición 35 a posición 49), FW3 (posición 57 a posición 88) y FW4 (posición 98 a posición 108), en donde la posición de aminoácido se indica usando el sistema de numeración expuesto en Kabat.

En algunas modalidades, la presente descripción provee un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una región de estructura
10 variable de cadena ligera que es el producto de o derivado del gen de humano IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24), y en donde la región de estructura variable de cadena ligera comprende por lo menos una modificación de aminoácido de la región de estructura correspondiente de la región variable de cadena ligera del anticuerpo de murino correspondiente.

15 En algunas modalidades, la presente descripción provee un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39, y en donde la región de estructura variable de cadena ligera de la secuencia de la cadena ligera comprende por lo menos una modificación de aminoácido de la
20 región de estructura variable de cadena ligera correspondiente del anticuerpo de murino correspondiente.

De preferencia, la modificación de aminoácido comprende una sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido seleccionada del

grupo que consiste de 1, 33, 34, 46, 47, 54, 56 y 71 y/o una delección en la posición de aminoácido 31, más preferiblemente una sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de 33, 34, 46, 47, 54, 56 y 71 y/o una delección en la posición de aminoácido 31, más preferiblemente una sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido 46 y/o 47, en donde la posición de aminoácido de cada miembro de grupo se indica de acuerdo con la numeración de Kabat. Específicamente, la modificación de aminoácido comprende una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de 1Q, 33M, 34H, 46P, 47W, 54L, 56S y 71Y, y/o una delección en T31, de preferencia una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de 1Q, 33M, 34H, 46P, 47W, 54L, 56S y 71Y, más preferiblemente una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de 33M, 34H, 46P, 47W y 71Y, mientras que 46P, 47W se prefieren particularmente, en donde la posición de aminoácido de cada miembro de grupo se indica de acuerdo con la numeración de Kabat.

En algunas modalidades, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano comprende una región de estructura variable de cadena pesada que es el producto de o derivado de un gen de humano seleccionado del grupo que consiste de V2-70*10 (SEQ ID NO: 19), V2-70*01 (SEQ ID NO: 20), V2-70*13 (SEQ ID NO: 21), V2-5*09 (SEQ ID NO: 22) y V2-70*11 (SEQ ID NO: 23), y una región de estructura variable de cadena ligera que es el producto de o derivado de un gen de humano seleccionado del grupo que consiste de V3-11*01 (SEQ ID NO: 24),

5b

41 \

IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) e IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28), de preferencia una región de estructura variable de cadena pesada que es el producto de o derivado del gen de humano V2-70*10 (SEQ ID NO: 19) y una región de estructura variable de cadena ligera que es el producto de o derivado del gen de humano V3-11*01 (SEQ ID NO: 24). También combinaciones de las regiones de estructura variable de cadena pesada que están presentes en el producto de o derivado de diferentes genes de humano mencionados anteriormente y/o de regiones de estructura de región variable de cadena ligera que están presentes en el producto de o derivado de diferentes genes de humano mencionados anteriormente, son abarcadas por la presente invención.

Secuencias de ADN de la línea germinal para genes de la región variable de cadena ligera y pesada de humano pueden encontrarse en la base de datos de secuencias de la línea germinal de humano "VBase" (disponible en la Internet en www.mrccpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat EA *et al.*, citado anteriormente; Tomlinson IM *et al.*, (1992) J. Mol. Biol. 227: 776-798 y Cox JPL *et al.*, (1994) Eur. J. Immunol. 24: 827-836. Como otro ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para genes de la región variable de cadena pesada y ligera de humano pueden encontrarse en la base de datos del Genbank.

En otro aspecto, la presente descripción provee también un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de

humano, en donde por lo menos una de las CDRs de cadena pesada y/o por lo menos una de las CDRs de cadena ligera comprende por lo menos una modificación de aminoácido. Puede llevarse a cabo mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediada por PCR para introducir las modificaciones, y el efecto sobre la unión al anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, puede evaluarse en pruebas *in vitro* o *in vivo*. De preferencia, se introducen modificaciones conservativas. Las modificaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácido, pero son de preferencia sustituciones. Típicamente, no más de cinco, de preferencia no más de cuatro, más preferiblemente no más de tres, aún más preferiblemente no más de dos, muy preferiblemente no más de una modificación de aminoácido se lleva a cabo dentro de una región de CDR.

En ciertas modalidades, pueden usarse secuencias de estructura para diseñar regiones variables para producir anticuerpos variantes. Los anticuerpos variantes de la invención incluyen aquellos en los cuales se han hecho modificaciones a los residuos de estructura dentro de la VH y/o VK, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, dichas modificaciones de estructura se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un procedimiento de "mutar en forma retrógrada" uno o más residuos de estructura a la secuencia de murino correspondiente, o "mutar en forma retrógrada" uno o más residuos de estructura a una secuencia de la línea germinal correspondiente.

De esta manera, en otro aspecto, la presente descripción provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano, en donde por lo menos una de las secuencias de la región de estructura de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende por lo menos una modificación de aminoácido de la región de estructura correspondiente de la región variable de cadena pesada del anticuerpo de murino correspondiente. De preferencia, la modificación de aminoácido es una sustitución de aminoácido. Típicamente, no más de seis, de preferencia no más de cinco, de preferencia no más de cuatro, más preferiblemente no más de tres, aún más preferiblemente no más de dos, muy preferiblemente no más de una modificación de aminoácido se realizan dentro de una región de estructura. En algunas modalidades, la presente descripción provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano, en donde la modificación de aminoácido de las regiones de estructura de la región variable de cadena pesada comprende una sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de 23, 35b, 48, 50, 60 y 62, y en donde la posición de aminoácido de cada miembro de grupo se indica de acuerdo con la numeración de Kabat. Las sustituciones de aminoácido preferidas de las regiones de estructura de la región variable de cadena pesada son en las posiciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste de 23, 35b, 50, 60 y 62. Sustituciones de aminoácido más preferidas de las regiones de estructura de la región variable de cadena pesada se seleccionan del grupo

que consiste de 23S, 35bG, 48L, 50H, 60N y 62A, mientras que 35bG es la sustitución de aminoácido más preferida de las regiones de estructura de la región variable de cadena pesada.

La presente descripción provee también un anticuerpo
5 antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano, en donde por lo menos una de las secuencias de la región de estructura de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende por lo menos una modificación de aminoácido de la región de estructura correspondiente de la región variable de cadena ligera del
10 anticuerpo de murino correspondiente. De preferencia, la modificación de aminoácido es una sustitución de aminoácido y/o una delección de aminoácido. Típicamente, no más de seis, de preferencia no más de cinco, de preferencia no más de cuatro, más preferiblemente no más de tres, aún más preferiblemente no más de dos, muy preferiblemente no más de una
15 modificación de aminoácido se realizan dentro de una región de estructura. En algunas modalidades, la presente descripción provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo, en donde la modificación de aminoácido de las regiones de estructura de la secuencia de la región variable de cadena ligera comprende una sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido
20 seleccionada del grupo que consiste de 1, 33, 34, 46, 47, 54, 56 y 71 y/o una delección en la posición de aminoácido 31. Modificaciones de aminoácido más preferidas de las regiones de estructura de la secuencia de la región variable de cadena ligera comprenden una delección en Y31 y/o una sustitución

seleccionada del grupo que consiste de 1Q, 33M, 34H, 46P, 47W, 54L, 56S y 71Y, y en donde la posición de aminoácido de cada miembro de grupo se indica de acuerdo con la numeración de Kabat. Modificaciones de aminoácido más preferidas de las regiones de estructura de la secuencia de la región variable de cadena ligera comprenden una delección en T31 y/o una sustitución seleccionada del grupo que consiste de 33M, 34H, 46P, 47W y 71Y, mientras que 46P y/o L47W se prefieren particularmente. En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de la presente invención puede comprender modificaciones de aminoácido de las regiones de estructura de la secuencia de la región variable de cadena pesada como se expuso anteriormente y modificaciones de aminoácido de las regiones de estructura de la secuencia de la región variable de cadena ligera como se expuso anteriormente.

La presente descripción provee también un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 29, 58, 59, 77, 78, 79 y 80, de preferencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 58, 59, 79 y 80, y más preferiblemente del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 58 y 59. La presente descripción provee también un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 30, 60, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 y 89, de preferencia seleccionada del grupo que

consiste de SEQ ID NOS: 60, 86, 87 y 89, más preferiblemente SEQ ID NO: 60. En algunas modalidades, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 29, 58, 59, 77, 78, 79 y 80, y una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 30, 60, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 y 89. Dado que cada una de estas secuencias de la región variable de cadena ligera y pesada puede unirse a OX40 de humano, las secuencias de la región variable de cadena ligera y pesada pueden ser "mezcladas y apareadas" para crear las moléculas de unión anti-OX40 de la invención. La unión a OX40 de dichos anticuerpos "mezclados y apareados" puede ponerse a prueba usando las pruebas de unión descritas, por ejemplo, en los ejemplos.

En algunas modalidades, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 58 y 59, y una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 60 y 89. En modalidades más preferidas, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 y una región variable de cadena ligera que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89, una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89. Más preferido es un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 58 y 59, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.

La presente descripción provee también un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38, de preferencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 35, 36, 37 y 38, y más preferiblemente del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 37 y 38. La presente descripción provee también un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 y 49, de preferencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 45, 46, 47 y 49, más preferiblemente SEQ ID NO: 47. En algunas modalidades, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo

que se une a OX40 de humano comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38, y una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 y 49. Dado que cada una de estas secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera puede unirse a OX40 de humano, las secuencias de la región variable de cadena ligera y pesada pueden ser "mezcladas y apareadas" para crear las moléculas de unión anti-OX40 de la invención. La unión a OX40 de dichos anticuerpos "mezclados y apareados" pueda ponerse a prueba usando las pruebas de unión descritas, por ejemplo, en los ejemplos.

En algunas modalidades, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 37 y 38, y una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 47 y 49. En modalidades más preferidas, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 y una secuencia

de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, o una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49. Más preferido es un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 37 y 38, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47.

En una modalidad de la presente descripción, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo es un anticuerpo de murino, anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado, de preferencia un anticuerpo humanizado, más preferiblemente un anticuerpo de murino monoclonal, un anticuerpo quimérico monoclonal o un anticuerpo humanizado monoclonal.

La presente descripción provee también un anticuerpo monovalente o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano, es decir, un anticuerpo que consiste de un brazo individual de unión al antígeno. La presente descripción provee también un fragmento de un anticuerpo que se une a OX40 de humano seleccionado del grupo que consiste de Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')₂, scFv, dímeros de Fv de cadena sencilla biespecíficos, cuerpos bivalentes, cuerpos trivalentes y scFv fusionado genéticamente con el mismo anticuerpo o un anticuerpo diferente. Fragmentos preferidos son scFv, dímeros de Fv de cadena sencilla biespecíficos y cuerpos

bivalentes. La presente descripción provee también un anticuerpo de longitud completa que se une a OX40 de humano.

La presente descripción provee también un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende además

5 una región constante de cadena pesada y/o ligera, en particular una región constante de cadena pesada de humano y/o una región constante de cadena ligera de humano. Las regiones constantes de cadena pesada de humano pueden seleccionarse del grupo de inmunoglobulinas de humano que consisten de IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4),

10 IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD) o IgE (IGHE), mientras que se prefiere la región constante de cadena pesada de humano IgG, en particular IgG1 (IGHG1). La región constante de cadena ligera de humano puede seleccionarse del grupo de inmunoglobulinas de humano que consisten de las regiones constantes kappa o lambda, mientras que se prefiere la región

15 constante kappa de humano. En una modalidad preferida, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 (IGHG1) de humano y un dominio constante kappa de cadena ligera de humano.

Además o en forma alternativa a las modificaciones hechas

20 dentro de las regiones de estructura o regiones de CDR, los anticuerpos de la invención pueden ser diseñados para que incluyan modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como vida media en suero, fijación del complemento, unión

6b

al receptor de Fc y/o citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede ser químicamente modificado (por ejemplo, una o más porciones químicas pueden ser unidas al anticuerpo) o puede ser modificado para alterar su glucosilación. Cada una de estas

5 modalidades se describe en más detalle a continuación. Las modificaciones dentro de la región Fc como se esbozan a continuación, son de acuerdo con la numeración de EU de los residuos en la región Fc. En una modalidad, la región de gozne de CH1 es modificada de modo que el número de residuos de cisteína en la región de gozne es alterado, por ejemplo, incrementado o

10 disminuido. Este procedimiento se describe además en la patente de los Estados Unidos No. 5,677,425 por Bodmer *et al.* El número de residuos de cisteína en la región de gozne de CH1 es alterado para, por ejemplo, facilitar el ensamble de las cadenas pesada y ligera, o para incrementar o disminuir la estabilidad del anticuerpo. En otra modalidad, la región de gozne de la región

15 Fc de un anticuerpo es mutada para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, una o más mutaciones de aminoácido son introducidas en la región de la zona interfacial del dominio CH2-CH3 del fragmento de gozne de la región Fc, de modo que el anticuerpo tenga unión deteriorada a la proteína A estafilocócica (SpA) respecto a la unión a la SpA

20 del dominio de gozne de la región Fc nativa. Este procedimiento se describe en más detalle en la patente de los Estados Unidos No. 6,165,745 por Ward *et al.* En otra modalidad, el anticuerpo es modificado para incrementar su vida media biológica. Varios procedimientos son posibles. Por ejemplo, una o más

de las siguientes mutaciones pueden ser introducidas: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 6,277,375 a Ward. En forma alternativa, para incrementar la vida media biológica, el anticuerpo puede ser alterado dentro de la región CH1 o CL para que contenga un epítotope silvestre de unión al receptor tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,869,046 y 6,121,022 por Presta *et al.* En otra modalidad, la región Fc es alterada reemplazando por lo menos un residuo de aminoácido con un diferente residuo de aminoácido para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácido 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 pueden ser reemplazados con un diferente residuo de aminoácido, de modo que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando del efector, pero retenga la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo precursor. El ligando del efector para el cual la afinidad es alterada puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Este procedimiento se describe en más detalle en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,624,821 y 5,648,260, ambas por Winter *et al.* En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácido 329, 331 y 322 pueden ser reemplazados con un residuo de aminoácido diferente, de modo que el anticuerpo tenga unión a C1q alterada y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o suprimida. Este procedimiento se describe en más detalle en la patente de los Estados Unidos No. 6,194,551 por Idusogie *et*

al. En otro ejemplo, uno o más residuos de aminoácido dentro de las posiciones de aminoácido 231 a 238 en la región N-terminal del dominio CH2 son alterados para alterar de esta manera la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este procedimiento se describe adicionalmente en la publicación del PCT WO94/29351 por Bodmer *et al.* En otro ejemplo más, la región Fc es modificada para incrementar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o para incrementar la afinidad del anticuerpo por un receptor de Fcγ modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Este procedimiento se describe adicionalmente en la publicación del PCT WO00/42072 por Presta.

La presente descripción provee también un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende regiones constantes de cadena pesada y/o ligera de humano, en donde la región constante de cadena pesada de humano comprende una variante isotópica que comprende la región CH1, la región de gozne, la región CH2 y la región CH3 de IgG4 de humano (IGHG4), y en donde la región de gozne comprende una sustitución de serina en la posición 228 por prolina. De preferencia, el anticuerpo humanizado que comprende la variante isotópica es

un anticuerpo de longitud completa. Un anticuerpo humanizado preferido particular o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una variante isotípica que comprende la región CH1 de IgG4 de humano (IGHG4), la región de gozne de IgG4 de humano (IGHG4), que tiene
5 la sustitución S228P y las regiones CH2 y CH3 de IgG4 de humano (IGHG4), comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47. Se ha encontrado que la variante isotípica no exhibe mecanismos de citotoxicidad
10 mediada por Fc tal como ADCC, en comparación con un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una región constante de cadena pesada de humano de IgG1 de humano (IGHG1) (la cual es usualmente una IgG1 nativa de humano), es decir, en comparación con un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo
15 que se une a OX40 de humano que difiere sólo de la variante isotípica con respecto a la región constante de cadena pesada modificada.

La presente descripción provee también un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una región Fc de IgG de humano, en donde la estructura de
20 carbohidratos del núcleo maduro unida a la región Fc de IgG de humano carece de fucosa (referida en la presente en forma alternativa como "no fucosilada"). De preferencia, el anticuerpo comprende una región Fc de IgG1 de humano (IGHG1), en donde la estructura de carbohidratos del núcleo

maduro unida a la región Fc de IgG1 de humano (IGHG1) carece de fucosa. Más preferido es un anticuerpo de longitud completa que comprende una región Fc de IgG1 de humano (IGHG1), en donde la estructura de carbohidratos del núcleo maduro unida a la región Fc de IgG1 de humano (IGHG1) carece de fucosa. Se sabe del documento WO03/035835 que la falta de fucosa en la estructura de carbohidratos del núcleo maduro unida a la región Fc de IgG de humano puede aumentar la ADCC. De esta manera, en otra modalidad, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo de la presente descripción comprende una región Fc de IgG1 de humano (IGHG1), en donde la estructura de carbohidratos del núcleo maduro unida a la región Fc de IgG1 de humano (IGHG1) carece de fucosa, mientras que el anticuerpo que carece de fucosa exhibe ADCC aumentada en comparación con el anticuerpo humanizado precursor o fragmento del mismo que no carece de fucosa. Métodos para generar anticuerpos que carecen de fucosa son, por ejemplo, (a) el uso de una célula hospedera diseñada o mutante que sea deficiente en el metabolismo de la fucosa, de modo que tenga una capacidad reducida (o sea incapaz de) fucosilar las proteínas expresadas en la misma; (b) el cultivo de células bajo condiciones que prevengan o reduzcan la fucosilación; (c) la remoción post-traducción de la fucosa (por ejemplo, con una enzima fucosidasa); (d) la adición post-traducción del carbohidrato deseado, por ejemplo, después de la expresión recombinante de una glucoproteína no glucosilada; o (e) la purificación de la glucoproteína para seleccionar para el producto que no es fucosilado. Usados de preferencia son

los métodos descritos en el ejemplo 14 del documento WO10/095031, por ejemplo, los métodos descritos en Longmore *et al.*, (1982) Carbohydr. Res. 365-92 o en Imai-Nishiya *et al.*, (2007), BMC Biotechnol. 7: 84.

Provisto también por la presente invención es un anticuerpo
5 antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano y el cual se une al mismo epítipo que el anticuerpo que comprende la secuencia variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 7 y/o la secuencia variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 8. Provisto también por la presente
10 invención es una región o epítipo específico de OX40 de humano, en particular del dominio extracelular del receptor de OX40 de humano, el cual es unido por un anticuerpo provisto por la presente invención, en particular por un anticuerpo que comprende la secuencia variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 7 y/o la secuencia
15 variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 8. Esta región o epítipo específico del polipéptido OX40 de humano puede identificarse mediante cualquier método adecuado de mapeo de epítopes conocido en la técnica, en combinación con cualquiera de los anticuerpos provistos por la presente invención. Ejemplos de dichos métodos
20 incluyen la selección de péptidos de longitudes variables derivados de OX40 por la unión al anticuerpo de la presente invención con el fragmento más pequeño que puede unirse específicamente al anticuerpo que contiene la secuencia del epítipo reconocido por el anticuerpo. Los péptidos OX40

pueden producirse sintéticamente o mediante la digestión proteolítica del polipéptido OX40. Los péptidos que se unen al anticuerpo pueden identificarse, por ejemplo, mediante análisis espectrométrico de masa. En otro ejemplo, puede usarse espectroscopía de RMN o cristalografía de rayos X para identificar el epítipo unido por un anticuerpo de la presente invención. Una vez identificado, el fragmento epitópico que se une a un anticuerpo de la presente invención puede usarse, si es requerido, como un inmunógeno para obtener anticuerpos antagonistas adicionales que se unen al mismo epítipo.

10 Propiedades de los anticuerpos anti-OX40

Se conocen en la técnica pruebas estándar para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos hacia, por ejemplo, OX40 de humano, e incluyen, por ejemplo, ELISAs, BIAcore®, Western blots, RIAs y análisis de citometría de flujo. Pruebas adecuadas se describen en detalle en los ejemplos. La cinética de unión (por ejemplo, afinidad de unión como KD) de los anticuerpos puede evaluarse también mediante pruebas estándar conocidas en la técnica, tales como mediante Scatchard o análisis con el sistema BIAcore®. La afinidad de unión relativa K_i puede evaluarse mediante pruebas de competencia estándar conocidas en la técnica.

20 En otro aspecto, la presente invención provee anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen a OX40 de humano y que bloquean una reacción mixta de linfocitos (MLR) de humano en una manera dependiente de la dosis a un mayor grado que el anticuerpo

humanizado recombinante efalizumab. El anticuerpo humanizado recombinante efalizumab se une a la subunidad CD11a del antígeno 1 asociado con la función de los linfocitos. Puede llevarse a cabo la MLR y puede medirse de acuerdo con el ejemplo 3.

5 En otro aspecto, la presente invención provee anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen a OX40 de humano y los cuales son también capaces de reconocer a OX40 de monos Cynomolgus. La unión de un anticuerpo anti-OX40 antagonista a células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de humano y de monos Cynomolgus puede
10 llevarse a cabo y puede medirse de acuerdo con el ejemplo 4 y como se muestra en la figura 3. Se encontró que el anticuerpo reconoce a OX40 que se expresa sobre la superficie de linfocitos activados de humano y de monos Cynomolgus, indicando que este anticuerpo tiene propiedades de reactividad cruzada.

15 En otro aspecto, la presente invención provee anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen a OX40 de humano, en particular OX40 de humano en forma aislada, con una afinidad (K_D) de 500 nM o menos, de preferencia 200 nM o menos, más preferiblemente 150 nM o menos, más preferiblemente 120 nM o menos, aún más preferiblemente 110
20 nM o menos, por ejemplo, medida mediante resonancia de plasmones de superficie (SPR) en un instrumento BIAcore® (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza), capturando el anticuerpo sobre un chip sensor de grado investigación CM5 acoplado a proteína A (GE Healthcare Europe GmbH,

Glattbrugg, Suiza; BR-1000-14) con un dominio extracelular del receptor de OX40 monovalente recombinante de humano (SEQ ID NO: 11) usado como analito como se describe en los ejemplos 5 y 6 y como se ilustra en la figura 4. El término "monovalente", como se usa en la presente con relación a mediciones de afinidad usando el receptor de OX40, se refiere a un dominio del receptor de OX40 de humano, tal como el dominio extracelular, no dimerizado o multimerizado artificialmente como sería, por ejemplo, si el dominio fuese fusionado amino-terminalmente con una porción de Fc de inmunoglobulina. En un aspecto preferido, la presente invención provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que retiene por lo menos 75% de la afinidad de unión (K_D) a OX40 del anticuerpo quimérico correspondiente. De preferencia, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo se une a OX40 de humano con una afinidad equivalente al anticuerpo quimérico correspondiente. Por el término "afinidad equivalente" se entiende un valor de afinidad que está dentro de una escala de $\pm 10\%$ de la afinidad de unión a OX40 del anticuerpo quimérico correspondiente. Más preferiblemente, la presente invención provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano con una afinidad mayor que el anticuerpo quimérico correspondiente. En un aspecto preferido de la presente invención, se proveen anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen a OX40 de humano que tienen una afinidad de unión (K_D) de 110 nM o menos, de preferencia 100 nM o menos, más preferiblemente 90 nM o menos, más preferiblemente 80 nM o menos, aún más preferiblemente 70 nM o

menos, por ejemplo, medida mediante la técnica de resonancia de plasmones de superficie (SPR) en un instrumento BIAcore® (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza) capturando el anticuerpo sobre un chip sensor de grado investigación CM5 acoplado a proteína A (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza; BR-1000-14) con un dominio extracelular del receptor de OX40 monovalente recombinante de humano (SEQ ID NO: 11) usado como analito como se detalla en los ejemplos 5 y 6 y como se ilustra en la figura 4.

Otro aspecto de la presente invención provee anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen a OX40 de humano y que tienen buena estabilidad térmica. En una modalidad preferida, un anticuerpo humanizado antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano tiene un fragmento FAB cuya temperatura de termoestabilidad es mayor de 70°C, de preferencia mayor de 75°C, más preferiblemente mayor de 80°C, y aún más preferiblemente mayor de 85°C. Para el análisis de la termoestabilidad del fragmento FAB se usan mediciones de calorimetría de barrido diferencial, en vista de que se identifica una temperatura de fusión de punto medio del fragmento FAB en el contexto de una IgG de longitud completa. Estos tipos de mediciones calorimétricas son conocidos por los expertos en la técnica, y pueden llevarse a cabo de acuerdo con, por ejemplo, Garber y Demarest (2007), BBRC, 355: 751-7, como se describe adicionalmente en el ejemplo 6 y se muestra en la figura 6.

En otro aspecto, la presente invención describe anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen a un epítoto en la región extracelular de OX40 de humano. Como se describe en el ejemplo 7 y como se muestra en la figura 7, uno o más de los cuatro dominios de la región extracelular de OX40 fueron intercambiados entre secuencias de humano y de rata y proteínas de fusión de Fc generadas. Una ELISA de unión se llevó a cabo entonces para poner a prueba la reactividad de un anticuerpo humanizado antagonista en la región extracelular de OX40 de humano, la región extracelular de OX40 de rata y cuatro proteínas quiméricas de humano-rata. De esta manera, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que mapea dentro del segundo dominio de la región extracelular de OX40 de humano.

La presente invención provee también anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que pueden usarse para suprimir reacciones inmunes. El efecto de un anticuerpo anti-OX40 humanizado antagonista se puso a prueba en una MLR (véase el ejemplo 8) usada como un modelo *in vitro* de activación y proliferación de células T alorreactivas (O'Flaherty E *et al.*, (2000) Immunology, 100(3): 289-99; DuPont B y Hansen JA (1976) Adv. Immunol. 23: 107-202). Se mezclaron PBMCs de dos donadores no emparentados, resultando en la activación de células T y una proliferación de linfocitos T. Además, tres diferentes formatos del anticuerpo anti-OX40 humanizado antagonista se pusieron a prueba en esta prueba: un formato de IgG1 (IGHG1), un formato de IgG1 no fucosilada (IGHG1) y un formato de

IgG4 (IGHG4), para determinar adicionalmente la contribución de mecanismos citotóxicos tales como la ADCC sobre la inhibición de la MLR. El anticuerpo anti-OX40 humanizado antagonista inhibió eficientemente la MLR en dos diferentes individuos (respondedores) con valores de EC50 de
5 aproximadamente 100 ng/mL. Sin embargo, los resultados mostraron una diferencia dependiendo del formato del anticuerpo usado. En el primer individuo (respondedor 1), la reactividad de las células T fue inhibida eficientemente por los formatos de los anticuerpos de IgG1 (IGHG1) e IgG4 (IGHG4), indicando que los mecanismos citotóxicos no son críticos para este
10 individuo. Para el segundo individuo (respondedor 2), el formato de IgG1 (IGHG1) logró más de 60% de inhibición, mientras que el formato de IgG4 (IGHG4) sólo bloqueó deficientemente la MLR. En ambos individuos, el formato de IgG1 no fucosilada (IGHG1) fue muy eficaz para inhibir la MLR. Estos resultados indican que el bloqueo de la activación de OX40 puede ser
15 suficiente en algunos individuos para inhibir la MLR, pero este efecto puede ser aumentado ampliamente por mecanismos citotóxicos adicionales. Por lo tanto, para el tratamiento de pacientes que sufren de trastornos mediados por OX40, en donde el trastorno parece ser independiente del estado co-estimulador de OX40 de los pacientes, por ejemplo, pacientes con bajos
20 niveles de expresión de OX40, la administración de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano y el cual tiene mecanismos citotóxicos aumentados, puede ser particularmente efectiva. Una modalidad preferida de la presente invención provee un anticuerpo

humanizado antagonista que se une a OX40 de humano para el tratamiento de un paciente que sufre de un trastorno mediado por OX40. Además, el paciente puede tener bajos niveles de expresión de OX40. De preferencia, el anticuerpo humanizado antagonista que se une a OX40 de humano
5 comprende una región de IgG1 (IGHG1). Más preferiblemente, el anticuerpo humanizado antagonista que se une a OX40 de humano comprende una región de IgG1 no fucosilada.

En otro aspecto de la presente invención, el efecto de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo se demostró en una reacción
10 de injerto xenogénico contra hospedero, en la cual ratones SCID fueron reconstituidos con PBMCs de humano. Esta reacción provee un modelo para la enfermedad de injerto alogénico contra hospedero (GVHD) observada después del trasplante de médula ósea en pacientes humanos. En este modelo, PBMCs y linfocitos T de humano en particular, lanzan una fuerte
15 respuesta contra las células hospederas de ratón que da lugar a síntomas inflamatorios severos. Como se describe en el ejemplo 9 y como se muestra en la figura 9 y el cuadro 10, un anticuerpo humanizado antagonista que se une a OX40 de humano suprimió potentemente la reacción de la GVHD a una dosis de 1 mg/kg. En forma sorprendente, este anticuerpo demostró una mejor
20 eficacia que Enbrel[®], una terapia reconocida para la GVHD (Xhaard A *et al.*, (2011) Bull. Cancer, 98(8): 889-99; Simpson D (2001) Expert Opin. Pharmacother. 2(7): 1109-17). Por lo tanto, en una modalidad preferida, la presente invención provee un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo

que se une a OX40 de humano y el cual es efectivo en el tratamiento de la GVHD. De preferencia, la administración del anticuerpo a un sujeto resulta en una mejora de cuatro veces en el valor medio de supervivencia (días) en comparación con la administración de vehículo. Más preferiblemente, la administración del anticuerpo a un sujeto resulta en una mejora de dos veces en el valor medio de supervivencia (días) en comparación con la administración de Enbrel®. La presente invención provee por lo tanto un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que es más efectivo que Enbrel® en el tratamiento de un paciente con GVHD y/o en la supresión de la GVHD. Además, se ha reportado que los anticuerpos de unión anti-OX40 agonistas empeoran la GVHD en modelos de GVHD en el ratón alogénico (Valzasina B *et al.*, (2005) *Blood*, 105(7): 2845-51; Blazar BR *et al.*, (2003) *Blood*, 101(9): 3741-8); por lo tanto, puede concluirse del ejemplo 9, que los anticuerpos antagonistas y fragmentos de los mismos de la presente invención no muestran efectos agonistas sobre la unión a OX40 de humano, ya que ningún empeoramiento de la GVHD se observó en el modelo. Por lo tanto, la presente invención provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano y que no muestra actividad agonista sobre la unión.

20

Ácidos nucleicos, vectores y células hospederas

La presente descripción provee también ácidos nucleicos aislados que codifican para los anticuerpos y fragmentos de los mismos que

se unen a OX40 de humano, vectores y células hospederas que comprenden el ácido nucleico o el vector. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado de células, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "se hace que sea sustancialmente puro", cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, que incluyen tratamiento alcalino/con SDS, efecto de banda de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN, y puede o no contener secuencias de intrones. En una modalidad preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse usando técnicas estándar de biología molecular, por ejemplo, moléculas de ADNc que codifiquen para las cadenas ligera y pesada del anticuerpo o que codifiquen para los segmentos VH y VL, y pueden obtenerse mediante técnicas de clonación de ADNc o de amplificación por PCR estándar. Para anticuerpos obtenidos de una colección de genes de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de exhibición de fagos), uno o más ácidos nucleicos que codifiquen para el anticuerpo pueden recuperarse de la colección. Los métodos para introducir ácido nucleico exógeno en células hospederas son

bien conocidos en la técnica, y variarían con la célula hospedera usada. Las técnicas incluyen, pero no están limitadas a, transfección mediada por dextrán, precipitación con fosfato de calcio, tratamiento con cloruro de calcio, transfección mediada por polietilenimina, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, infección por virus o fagos, encapsulación de los polinucleótidos en liposomas, y microinyección directa del ADN en núcleos. En el caso de células de mamífero, la transfección puede ser transitoria o estable.

Las moléculas de ácido nucleico preferidas de la invención son aquellas que codifican para la secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38 y/o la secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 y 49. Las moléculas de ácido nucleico preferidas de la invención son aquellas que codifican para la región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 29, 58, 59, 77, 78, 79 y 80 y/o la región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 30, 60, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 y 89.

Las moléculas de ácido nucleico preferidas de la invención son aquellas que codifican para la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 8 y/o la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7, por ejemplo, ADN que codifica para la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 9 y/o ADN que codifica para la

región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 10. Las moléculas de ácido nucleico más preferidas de la invención son aquellas que codifican para la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 58 o 59 y/o la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 60, por ejemplo, ADN que codifica para la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NOS: 61 o 62 y/o ADN que codifica para la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 63, las cuales son más preferidas.

- 10 Una vez que se obtienen fragmentos de ADN que codifican para los segmentos VH y VL, estos fragmentos de ADN pueden ser manipulados adicionalmente mediante técnicas estándar de ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en genes de la cadena de anticuerpo de longitud completa, o en fragmentos de genes que
- 15 correspondan a los fragmentos descritos anteriormente, tales como los genes del fragmento Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica para VH o VL es enlazado operativamente a otro fragmento de ADN que codifica para otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. Se pretende que el término
- 20 “enlazado operativamente”, como se usa en este contexto, signifique que los dos fragmentos de ADN son unidos de modo que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanezcan en el marco de lectura. El ADN aislado que codifica para la región VH puede ser

convertido en un gen de cadena pesada de longitud completa enlazando operativamente el ADN que codifica para VH con otra molécula de ADN que codifica para las regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de la región constante de cadena pesada de humano se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat EA *et al.*, citado anteriormente), y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD) o IgE (IGHE), pero más preferiblemente es una región constante de IgG1 (IGHG1). Para un gen de la cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica para VH puede ser enlazado operativamente con otra molécula de ADN que codifica para sólo la región constante CH1 de cadena pesada. El ADN aislado que codifica para la región VL puede ser convertido en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera de Fab) enlazando operativamente el ADN que codifica para VL con otra molécula de ADN que codifica para la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de la región constante de cadena ligera de humano se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat EA *et al.*, citado anteriormente.), y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante amplificación por PCR estándar. En modalidades preferidas, la región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, de preferencia una región constante kappa. Para

- crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican para VH y VL son enlazados operativamente con otro fragmento que codifica para un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica para la secuencia de aminoácidos (Gly4 - Ser3), de modo que las secuencias de VH y VL puedan ser expresadas como
- 5 una proteína contigua de cadena sencilla, con las regiones VH y VL unidas por el enlazador flexible (véase, por ejemplo, Bird RE *et al.*, (1988) Science, 242: 423-426; Huston JS *et al.*, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-83; McCafferty J *et al.*, (1990) Nature, 348: 552-554). Varias técnicas se han desarrollado para la producción de fragmentos de anticuerpo de anticuerpos.
- 10 Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron por medio de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto K *et al.*, (1992) J. Biochem. and Biophysical Methods, 24: 107-117, y Brennan M *et al.*, (1985) Science, 229: 81-3). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por medio de células hospederas recombinantes. Por
- 15 ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las colecciones de fagos de anticuerpos discutidas anteriormente. En forma alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, y pueden ser acoplados químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter P *et al.*, (1992) Bio/Technology, 10: 163-167). De acuerdo con otro procedimiento,
- 20 pueden aislarse directamente fragmentos F(ab')₂ del cultivo de células hospederas recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para los expertos en la técnica. En otras modalidades, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla

(scFv); véase, por ejemplo, el documento WO 1993/16185; la patente de los Estados Unidos No. 5,571,894 y la patente de los Estados Unidos No. 5,587,458. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5,641,870, por ejemplo.

Los ácidos nucleicos que codifican para los anticuerpos de la presente invención pueden ser incorporados en un vector, de preferencia un vector de expresión para expresar la proteína. Una variedad de vectores de expresión puede usarse para la expresión de proteínas. Los vectores de expresión pueden comprender vectores extracromosómicos auto-replicables o vectores que se integran en el genoma de un hospedero. Se construyen vectores de expresión que sean compatibles con el tipo de célula hospedera. De esta manera los vectores, de preferencia los vectores de expresión que encuentran uso en la presente invención incluyen, pero no están limitados a, aquellos que permiten la expresión de proteínas en células de mamífero, bacterias, células de insecto, levaduras, y en sistemas *in vitro*. Como se sabe en la técnica, está disponible una variedad de vectores de expresión, comercialmente o de otro modo, que pueden encontrar uso en la presente invención para la expresión de anticuerpos.

Los vectores de expresión comprenden típicamente una proteína enlazada operablemente con secuencias de control o reguladoras, marcadores seleccionables, cualquier miembro de fusión, y/o elementos adicionales. Por el término "enlazado operablemente", se entiende en la

presente que el ácido nucleico es puesto en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Se pretende que el término "secuencia reguladora" incluya promotores, intensificadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la

5 transcripción o traducción de los genes de la cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). En general, estos vectores de expresión incluyen un ácido nucleico regulador de la transcripción y traducción enlazado operablemente

10 con el ácido nucleico que codifica para el anticuerpo, y son típicamente apropiados para la célula hospedera usada que expresa la proteína. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción y traducción pueden incluir secuencias de promotor, sitios de unión del ribosoma, secuencias de inicio y detención de la transcripción, secuencias de inicio y detención de la

15 traducción, y secuencias de intensificador o activador. Como se sabe también en la técnica, los vectores de expresión contienen típicamente un gen o marcador de selección que permite la selección de las células hospederas transformadas que contienen al vector de expresión. Los genes de selección son bien conocidos en la técnica, y variarán con la célula hospedera usada.

20 Por ejemplo, típicamente, el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedera en la cual el vector ha sido introducido. Genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR)

g

(para su uso en células hospederas dhfr- con selección/amplificación por metotrexato) y el gen neo (para selección por G418).

Células hospederas adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores en la presente son células procarióticas, de levadura o

5 células eucarióticas superiores. Procariontes adecuados para este propósito incluyen eubacterias, que incluyen organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens* y

10 *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Hospederos de clonación de *E. coli* adecuados incluyen *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27,325). Además de procariontes, microbios eucarióticos tales como hongos filamentosos o

15 levaduras son hospederos de clonación o expresión adecuados. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura común del pan, es el usado más comúnmente entre los microorganismos hospederos eucarióticos inferiores. Sin embargo, muchos otros géneros, especies y cepas están disponibles comúnmente y son útiles, tales como los hospederos *Schizosaccharomyces*

20 *pombe*; *Kluyveromyces*, que incluyen a *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. walth* (ATCC 56,500), *K. drosopmarum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans* o *K. marxianusyarrowia* (documento EP402226); *Pichia pastoris* (documento

EP183070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP244234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos que incluyen a los hospederos *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* o *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* o *A. niger*.

5 Células hospederas adecuadas para la expresión de los anticuerpos de la invención se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plaril y de insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y que corresponden a células hospederas de insecto permisivas de hospederos tales como

10 *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas virales para transfección están disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus pueden usarse, en particular para la

15 transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Cultivos de células vegetales de algodón, maíz, papa, soya, petunia, tomate y tabaco pueden usarse también como hospederos.

Las células hospederas para la expresión de los anticuerpos recombinantes de la invención son de preferencia células hospederas de

20 mamífero que incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo las células CHO dhfr⁻, descritas en Urlaub G y Chasin LA (1980) Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 77: 4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman RJ y

Sharp PA (1982) J. Mol. Biol, 159: 601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para su uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión de genes GS descrito en los documentos WO 87/04462 (a Wilson), WO 89/01036 (a Bebbington) y EP338841 (a Bebbington). Cuando se introducen genes de anticuerpos recombinantes en células hospederas de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospederas por un período suficiente que permita la expresión del anticuerpo en las células hospederas o, más preferiblemente, para la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual las células hospederas se cultivan. Células hospederas útiles para la producción de anticuerpos que se unen a OX40 de humano pueden cultivarse en una variedad de medios. Medios disponibles comercialmente tales como medio F10 de Ham (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza), medio mínimo esencial (MEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH), medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Basel, Suiza), y medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH), son adecuados para el cultivo de las células hospederas. Pueden recuperarse los anticuerpos del medio de cultivo usando métodos estándar de purificación de proteínas.

Los anticuerpos pueden ser enlazados operablemente a un miembro de fusión que permita el direccionamiento de la proteína expresada, así como los pasos de purificación, selección, exhibición, y similares. Los miembros de fusión pueden ser enlazados a la secuencia del anticuerpo por

medio de las secuencias de un enlazador. La secuencia del enlazador comprenderá en general un pequeño número de aminoácidos, típicamente menos de 10, aunque pueden usarse también enlazadores más largos. Típicamente, se seleccionan secuencias de un enlazador que sean flexibles y resistentes a la degradación. Como los expertos en la técnica apreciarán, cualquiera de una amplia variedad de secuencias puede usarse como enlazadores. Por ejemplo, una secuencia de enlazador común comprende la secuencia de aminoácidos GGGGS. Un miembro de fusión puede ser una secuencia de direccionamiento o de señal que dirija al anticuerpo y cualquier miembro de fusión asociado, hacia un sitio celular deseado o hacia el medio extracelular. Como se sabe en la técnica, ciertas secuencias de señalización pueden elegir como objetivo una proteína para que sea secretada en el medio de crecimiento, o en el espacio periplásmico, localizado entre la membrana interior y exterior de la célula. Un miembro de fusión puede ser también una secuencia que codifique para un péptido o proteína que permita la purificación y/o selección. Dichos miembros de fusión incluyen, pero no están limitados a, marcadores de polihistidina (marcadores His) (por ejemplo, H6 y H10 u otros marcadores para su uso con sistemas de cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) (por ejemplo, columnas de afinidad por Ni^{+2})), fusiones de GST, fusiones de MBP, marcadores de estreptavidina, la secuencia objetivo de biotinilación BSP de la enzima bacteriana BirA, y marcadores de epítopes que son elegidos como objetivo por anticuerpos (por ejemplo, marcadores c-myc, marcadores flag, y similares). Como los expertos

en la técnica apreciarán, dichos marcadores pueden ser útiles para purificación, para selección, o ambas.

Construcción y producción de anticuerpos

5 Los anticuerpos generados contra el polipéptido OX40 pueden obtenerse mediante la inmunización de un animal, es decir, administrando los polipéptidos a un animal, de preferencia un animal no humano, usando protocolos de rutina y bien conocidos; véase, por ejemplo, Handbook of
10 Experimental Immunology (Weir DM (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos o cerdos pueden ser inmunizados. Sin embargo, ratones, conejos, cerdos y ratas, en particular ratones, son generalmente más adecuados. Pueden producirse anticuerpos también mediante técnicas de ADN recombinante conocidas por los expertos
15 en la técnica. Además, pueden producirse anticuerpos mediante la digestión enzimática o química de anticuerpos de ocurrencia natural. Los anticuerpos humanizados de la presente invención pueden construirse transfiriendo una o más CDRs o porciones de las mismas de las regiones VH y/o VL de un animal no humano (por ejemplo, ratón) a una o más regiones de estructura de las
20 regiones VH y/o VL de humano. Opcionalmente, los residuos de estructura de humano presentes de esta manera en las regiones VH y/o VL pueden ser reemplazados por residuos no de humano (por ejemplo, ratón) correspondientes cuando sea necesario o se desee para disminuir la

inmunogenicidad del anticuerpo y/o para mantener la afinidad de unión. Opcionalmente, los residuos de aminoácido no de humano presentes en las CDRs pueden ser reemplazados con residuos de humano. Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención pueden prepararse con

5 base en la secuencia de un anticuerpo monoclonal no de humano preparado como se describió anteriormente. ADN que codifica para las inmunoglobulinas de cadena ligera y pesada puede obtenerse del hibridoma no de humano de interés, y puede ser diseñado para que contenga secuencias de inmunoglobulina no de murino (por ejemplo, humano) usando técnicas

10 estándar de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, regiones variables de murino pueden ser enlazadas a regiones constantes de humano usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 4,816,567 a Cabilly *et al.*). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR de murino pueden ser

15 insertadas en una región de estructura de humano usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5,225,539 a Winter, y las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 a Queen *et al.*).

Pueden construirse los anticuerpos humanizados de la presente

20 invención, en donde la molécula aceptora de humano para la región variable de cadena pesada se selecciona con base en consideraciones de homología entre las regiones variables de la molécula aceptora potencial y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo de murino. Moléculas aceptoras

candidatas de la línea germinal de humano se prefieren para reducir la inmunogenicidad potencial. Se compilan bases de datos de la línea germinal de secuencias de anticuerpo que leen a través del extremo de la región FW3 de cadena pesada y parcialmente en la secuencia de la CDR3. Para la
5 selección de una región FW4, pueden buscarse bases de datos de secuencias de anticuerpo maduras que se hayan derivado de la molécula de la línea germinal seleccionada, o pueden usarse secuencias de anticuerpo que se hayan derivado de la molécula de la línea germinal seleccionada de un donador humano. Las moléculas aceptoras de humano se seleccionan de
10 preferencia de la misma clase de cadena pesada que la molécula donadora de murino, y de la misma clase estructural canónica de la región variable de la molécula donadora de murino. Consideraciones secundarias para la selección de la molécula aceptora de humano para la región variable de cadena pesada eluden la homología en la longitud de la CDR entre la molécula donadora de
15 murino y la molécula aceptora de humano. Las moléculas de anticuerpo aceptoras de humano se seleccionan de preferencia mediante la búsqueda de homología con la base de datos V-BASE, aunque pueden usarse también otras bases de datos tales como la base de datos de Kabat y la base de datos pública del NCBI.

20 Pueden construirse los anticuerpos humanizados de la presente invención, en donde la molécula aceptora de humano para la región variable de cadena ligera se selecciona con base en consideraciones de homología entre las regiones variables de la molécula aceptora potencial y la región

variable de la cadena ligera del anticuerpo de murino. Moléculas aceptoras candidatas de la línea germinal de humano se prefieren para reducir la inmunogenicidad potencial. Se compilan bases de datos de la línea germinal de secuencias de anticuerpo que leen a través del extremo de la región FW3
5 de cadena pesada y parcialmente en la secuencia de la CDR3. Para la selección de una región FW4, pueden buscarse bases de datos de secuencias de anticuerpo maduras que se hayan derivado de la molécula de la línea germinal seleccionada, o pueden usarse secuencias de anticuerpo que se hayan derivado de la molécula de la línea germinal seleccionada de un
10 donador humano. Las moléculas aceptoras de humano se seleccionan de preferencia de la misma clase de cadena ligera que la molécula donadora de murino, y de la misma clase estructural canónica de la región variable de la molécula donadora de murino. Consideraciones secundarias para la selección de la molécula aceptora de humano para la región variable de cadena ligera
15 eluden la homología en la longitud de la CDR entre la molécula donadora de murino y la molécula aceptora de humano. Las moléculas de anticuerpo aceptoras de humano se seleccionan de preferencia mediante la búsqueda de homología con la base de datos V-BASE, aunque pueden usarse también otras bases de datos tales como la base de datos de Kabat y la base de datos
20 pública del NCBI. Métodos para humanizar un anticuerpo no humano se describen en la presente, que se incluyen el ejemplo 6, más adelante.

La presente invención provee un método para producir un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de

humano, que comprende cultivar una célula hospedera que comprende un ácido nucleico aislado que codifica para el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano o un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica para el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano, de modo que el ácido nucleico es expresado y el anticuerpo producido. De preferencia, el anticuerpo es aislado. Para células hospederas, ácidos nucleicos y vectores, pueden usarse los descritos anteriormente. La expresión de los ácidos nucleicos puede lograrse, por ejemplo, mediante una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como es bien sabido en la técnica (véase, por ejemplo, Morrison S (1985) Science 229: 1202), y como adicionalmente se esbozó anteriormente. Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, moléculas de ADN que codifican para las cadenas ligera y pesada de longitud parcial o completa, pueden obtenerse mediante técnicas estándar de biología molecular (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación de ADNc usando un hibridoma que exprese el anticuerpo de interés), y las moléculas de ADN pueden ser insertadas en vectores tales como vectores de expresión. Se eligen el vector de expresión y las secuencias de control de la expresión que sean compatibles con la célula hospedera de expresión usada. El gen de la cadena ligera de anticuerpo y el gen de la cadena pesada de anticuerpo pueden ser insertados en un vector separado o, más típicamente, ambos genes son insertados en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo son insertados en el vector de

expresión mediante métodos estándar (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento y vector del gen del anticuerpo, o ligación del extremo rasurado si no están presentes sitios de restricción). Las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos descritos en la presente pueden usarse para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo, insertándolos en vectores de expresión que ya codifican para las regiones constantes de cadena ligera y las regiones constantes de cadena pesada del isotipo deseado, de modo que el segmento VH sea enlazado operativamente a los segmentos CH1 dentro del vector, y el segmento VK sea enlazado operativamente al segmento CK dentro del vector.

Caracterización y purificación de los anticuerpos anti-OX40

La selección de los anticuerpos puede llevarse a cabo usando pruebas que miden la unión a OX40 de humano y/o pruebas que miden la capacidad para bloquear la unión de OX40 a su ligando, OX40L. Un ejemplo de una prueba de unión es una ELISA, en particular, usando una proteína de fusión de OX40 de humano y una región Fc de humano, la cual es inmovilizada en placas, y usando un anticuerpo secundario conjugado que detecte el anticuerpo anti-OX40 unido a la proteína de fusión. Un ejemplo de una prueba de bloqueo es una prueba basada en citometría de flujo que mide el bloqueo de la unión de la proteína de fusión del ligando de OX40 a OX40 en células CD4 de humano. Un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia

se usa para detectar la cantidad de la proteína de fusión del ligando de OX40 que se une a la célula. Esta prueba busca una reducción en la señal conforme el anticuerpo en el sobrenadante bloquea la unión de la proteína de fusión del ligando a OX40. Otro ejemplo de una prueba de bloqueo es una prueba en
5 donde el bloqueo de la co-estimulación de células T no afectadas de humano mediada por la proteína de fusión del ligando de OX40 recubierta a una placa se mide midiendo la incorporación de timidina. Como una prueba para evaluar la actividad funcional de los anticuerpos anti-OX40, por ejemplo, la reducción de la activación de células T, puede usarse la reacción mixta de linfocitos
10 (MLR) de humano como se describe en los ejemplos 3 y 8.

Los anticuerpos de la presente invención pueden aislarse o purificarse en una variedad de modos conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos de purificación estándar incluyen técnicas cromatográficas, que incluyen cromatografía de intercambio iónico, de
15 interacción hidrofóbica, de afinidad, de dimensionamiento o filtración en gel, y de fase invertida, llevadas a cabo a presión atmosférica o a alta presión usando sistemas tales como FPLC y HPLC (CLAR). Los métodos de purificación incluyen también técnicas electroforéticas, inmunológicas, de precipitación, de diálisis y de cromatoenfoco. Son también útiles las técnicas
20 de ultrafiltración y diafiltración en conjunto con la concentración de proteínas. Para purificar los anticuerpos de OX40, pueden cultivarse células hospederas seleccionadas, por ejemplo, en matraces rotatorios para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes pueden ser filtrados y

concentrados antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sepharose (sefarosa) (Pharmacia, Piscataway, NJ). Pueden verificarse los anticuerpos eluidos mediante electroforesis en gel y cromatografía de líquidos de alto rendimiento para garantizar la pureza. Un anticuerpo preferido de la presente
 5 invención es de esta manera un anticuerpo aislado y/o purificado que se une a OX40 de humano.

Inmunosconjugados

En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo de
 10 OX40 antagonista o un fragmento del mismo que se une a OX40 de humano, enlazado a un agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Dichos conjugados son referidos en la presente como "inmunosconjugados". Los inmunosconjugados que incluyen una o más citotoxinas son referidos como "inmunotoxinas". Una
 15 citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (por ejemplo, destruir) las células. Ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenipósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracinaodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-
 20 dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen también, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-

fluorouracilo, dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) y cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Otros ejemplos de citotoxinas terapéuticas que pueden ser enlazadas a un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maytansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo y caliqueamicina está disponible comercialmente (Mylotarg(R); American Home Products). Las citotoxinas pueden ser enlazadas a los anticuerpos de la invención usando las tecnologías de enlazadores disponibles en la técnica. Ejemplos de tipos de enlazadores que se han usado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, pero no están limitados a, enlazadores que contienen hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y péptidos. Puede seleccionarse un enlazador que sea susceptible, por ejemplo, a la escisión por un pH bajo dentro del compartimiento lisosómico o susceptible a la digestión por proteasas, tales como las proteasas expresadas preferiblemente en un tejido tumoral, tales como las catepsinas (por ejemplo, las catepsinas B, C, D). Para más discusión de los tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, véase también Saito G *et al.*, (2003) Adv. Drug

Deliv. Rev. 55: 199-215; Trail PA *et al.*, (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52: 328-337; Payne G (2003) Cancer Cell, 3: 207-212; Allen TM (2002) Nat. Rev. Cancer, 2: 750-763; Pastan I y Kreitman RJ (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs, 3: 1089-1091; y Senter PD y Springer CJ, (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53: 247-264. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser enlazados también a un isótopo radiactivo para generar radiofarmacéuticos citotóxicos, referidos también como radioinmunoconjugados. Ejemplos de isótopos radiactivos que pueden ser conjugados con anticuerpos para uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero no están limitados a, yodo¹³¹, indio¹¹¹, itrio⁹⁰ y lutecio¹⁷⁷. Métodos para preparar radioinmunoconjugados están establecidos en la técnica. Ejemplos de radioinmunoconjugados están disponibles comercialmente, incluyendo Zevalin[®] (EDEC Pharmaceuticals) y Bexxar[®] (Corixa Pharmaceuticals), y pueden usarse métodos similares para preparar radioinmunoconjugados usando los anticuerpos de la invención. Los inmunoconjugados de anticuerpos de la invención pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, y no se considerará que la porción de fármaco se limita a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la porción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmento activo de la misma, tales como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina de la difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral o interferón- γ ; o modificadores de respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-

1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

Técnicas para enlazar dichos agentes terapéuticos a anticuerpos son bien conocidos; véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.*, (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2a. ed.), Robinson *et al.*, (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.*, (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.*, (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe PE y Ross WC (1982) *Immunol. Rev.* 62: 119-58.

En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo de OX40 antagonista o un fragmento del mismo que se une a OX40 de humano, administrado en conjunto con un agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención provee una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo, de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos, y/o inmunosupresores de la invención y/o un agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina como se describió anteriormente. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunosupresores) que se unen a diferentes epítopes en el antígeno objetivo o que tienen actividades complementarias. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse también en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo de OX40 antagonista de la presente invención combinado con por lo menos algún otro agente antiinflamatorio o inmunosupresor.

Como se usa en la presente, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes isotónicos y que retardan la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. De preferencia, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o

epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo o inmunoconjugado, puede ser recubierto en un material para proteger al compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar al compuesto.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o una dispersión. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Salvo hasta donde algún medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención. Compuestos activos complementarios pueden incorporarse también en las composiciones.

En otro aspecto, la presente invención provee una composición que comprende un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano, enlazado a un agente terapéutico y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los inmunoconjugados y agentes terapéuticos que pueden usarse son como se describieron anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención provee una composición que comprende el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo de la presente invención, el cual comprende además otro agente farmacéuticamente activo. De preferencia, el otro agente farmacéuticamente

activo es uno o más de: a) otro antagonista de OX40 de humano, b) un agente analgésico, y c) un agente inmunosupresor, por ejemplo, un glucocorticoide tal como prednisona.

Una composición farmacéutica de la invención puede incluir

5 también un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio, y similares; (2) antioxidantes liposolubles, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA),

10 hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares. Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen

15 agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento

20 del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de agentes tensoactivos. Estas composiciones pueden contener también adyuvantes tales como conservadores, agentes mojantes, agentes emulsificantes y agentes de dispersión. La prevención de la presencia de

microorganismos puede garantizarse mediante procedimientos de esterilización, como se mencionó anteriormente, y mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. Puede ser deseable también

5 incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede producirse mediante la inclusión de agentes que retarden la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

10 Usos terapéuticos y de otro tipo

Los anticuerpos antagonistas de la presente invención tienen numerosas utilidades terapéuticas y de diagnóstico *in vitro* e *in vivo* que incluyen el diagnóstico y tratamiento de trastornos mediados por OX40. Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a células en cultivo, *in vitro* o

15 *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y diagnosticar una variedad de trastornos mediados por OX40. Los sujetos preferidos son humanos e incluyen pacientes que tienen trastornos mediados por la actividad de OX40 (trastornos mediados por OX40). Los anticuerpos antagonistas de la presente invención pueden ser efectivos en el tratamiento

20 de pacientes independientemente de su estado co-estimulador de OX40. Los sujetos más preferidos son humanos, e incluyen pacientes que expresan un bajo nivel de OX40.

Un "paciente" para los propósitos de la presente invención, incluye tanto humanos como otros animales, de preferencia mamíferos y más preferiblemente humanos. De esta manera, los anticuerpos de la presente invención tienen aplicaciones en veterinaria y en terapia humana. Se entiende

5 que el término "tratamiento" o "tratar" en la presente invención incluye el tratamiento terapéutico, así como medidas profilácticas o supresoras de una enfermedad o trastorno. De esta manera, por ejemplo, la administración exitosa de un anticuerpo antes del inicio de la enfermedad resulta en el tratamiento de la enfermedad. Como otro ejemplo, la administración exitosa

10 de un anticuerpo después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad comprende el tratamiento de la enfermedad. Los términos "tratamiento" y "tratar" abarcan también la administración de un anticuerpo después de la aparición de la enfermedad para erradicar la enfermedad. La administración exitosa de un anticuerpo

15 después del inicio y después de que los síntomas clínicos se han desarrollado, con abatimiento posible de los síntomas clínicos y quizá la mejora de la enfermedad, comprende el tratamiento de la enfermedad. Aquellos "en necesidad de tratamiento" incluyen mamíferos que tienen ya la enfermedad o trastorno, así como aquellos propensos a que tengan la

20 enfermedad o trastorno, incluyendo aquellos en los cuales la enfermedad o trastorno se va a prevenir.

En una modalidad particular, los anticuerpos antagonistas se usan *in vivo* para tratar, prevenir o diagnosticar una variedad de trastornos

mediados por OX40. De esta manera, la invención provee un método para tratar un trastorno mediado por OX40 en un sujeto, el método comprendiendo administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo antagonista o fragmento del mismo. Ejemplos de trastornos mediados por

5 OX40 incluyen infecciones (virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias), choque endotóxico asociado con infección, artritis, artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Peyronie, enfermedad

10 celíaca, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad pilonidal, peritonitis, psoriasis, vasculitis, adherencias quirúrgicas, accidente cerebrovascular, diabetes tipo I, enfermedad de Lyme, artritis, meningoencefalitis, uveítis autoinmune, trastornos inflamatorios del sistema nervioso central y periférico mediados por el sistema inmune, tales como esclerosis múltiple, lupus (tal

15 como lupus eritematoso sistémico) y síndrome de Guillain-Barré, dermatitis atópica, hepatitis autoinmune, alveolitis fibrosante, enfermedad de Grave, nefropatía por IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Meniere, pénfigo, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, pancreatitis, trauma (quirúrgico), enfermedad de

20 injerto contra hospedero (GVHD), rechazo de trasplante, enfermedad cardiovascular que incluye enfermedades isquémicas tales como infarto al miocardio así como aterosclerosis, coagulación intravascular, resorción ósea, osteoporosis, osteoartritis, periodontitis, hipoclorhidria y neuromielitis óptica.

Otros ejemplos de trastornos mediados por OX40 incluyen infecciones (virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias), choque endotóxico asociado con infección, artritis, artritis reumatoide, asma, bronquitis, influenza, virus sincicial respiratorio, neumonía, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar idiopática (IPF), alveolitis fibrosante criptogénica (CFA), neumonía intersticial fibrosante idiopática, enfisema, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad pilonidal, peritonitis, psoriasis, vasculitis, adherencias quirúrgicas, accidente cerebrovascular, diabetes tipo I, enfermedad de Lyme, artritis, meningoencefalitis, uveítis autoinmune, trastornos inflamatorios del sistema nervioso central y periférico mediados por el sistema inmune, tales como esclerosis múltiple, lupus (tal como lupus eritematoso sistémico) y síndrome de Guillain-Barré, dermatitis atópica, hepatitis autoinmune, alveolitis fibrosante, enfermedad de Grave, nefropatía por IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Meniere, pénfigo, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, pancreatitis, trauma (quirúrgico), enfermedad de injerto contra hospedero (GVHD), rechazo de trasplante, enfermedad cardiovascular que incluye enfermedades isquémicas tales como infarto al miocardio así como aterosclerosis, coagulación intravascular, resorción ósea, osteoporosis, osteoartritis, periodontitis, hipoclorhidria y neuromielitis óptica.

Los trastornos mediados por OX40 preferidos que se van a tratar con el anticuerpo de la invención se seleccionan del grupo que consiste de esclerosis múltiple, artritis reumatoide, colitis, psoriasis, asma, EPOC, IPF, enfermedad de injerto contra hospedero (GVHD), aterosclerosis y diabetes.

- 5 Un trastorno mediado por OX40 preferido particular que se va a tratar con el anticuerpo de la invención, es la enfermedad de injerto contra hospedero (GVHD).

La presente invención provee también un anticuerpo para su uso en el tratamiento del dolor, en particular el dolor asociado con inflamación.

- 10 En una modalidad, los anticuerpos de la invención pueden usarse para detectar niveles de OX40, o niveles de células que contienen a OX40 sobre la superficie de su membrana, cuyos niveles pueden ser vinculados entonces con ciertos síntomas de enfermedad. En forma alternativa, los anticuerpos pueden usarse para inhibir o bloquear la función
- 15 de OX40 la cual, a su vez, puede ser vinculada con la prevención o mejora de ciertos síntomas de enfermedad, implicando de esta manera a OX40 como un mediador de la enfermedad. Esto puede lograrse poniendo en contacto una muestra y una muestra control con el anticuerpo de OX40 bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y OX40.
- 20 Cualquier complejo formado entre el anticuerpo y OX40 se detecta y se compara en la muestra y el control. A la luz de la unión específica de los anticuerpos de la invención a OX40, los anticuerpos de la invención pueden usarse para detectar específicamente la expresión de OX40 sobre la

superficie de las células, por ejemplo, pueden usarse para detectar a un paciente que tiene bajo nivel de expresión de OX40. Los anticuerpos de la invención pueden usarse también para purificar a OX40 por medio de purificación por inmutuafinidad.

5 De esta manera, la presente invención provee también un método de selección *in vitro* para detectar a un paciente que tiene un bajo nivel de expresión de OX40, que comprende los pasos de:

- (a) purificar células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de una muestra de sangre de un paciente;
- 10 (b) someter las PBMCs a análisis citométrico de flujo; y
- (c) determinar el número de células positivas para OX40 en células T CD4⁺ y/o CD8⁺, y comparar este número con niveles control.

En una modalidad preferida, un bajo nivel de expresión de OX40 se indica mediante un incremento en el nivel de expresión de células positivas para OX40 cuando se compara con niveles control de hasta 10%, más preferiblemente de hasta 20%, y aún más preferiblemente de hasta 30%. El procedimiento para determinar la expresión de OX40 se describe adicionalmente en detalle en Kotani A *et al.*, (2001) Blood, 98: 3162-4, y en Xiaoyan Z *et al.*, (2005) Clin. Exp. Immunol. 143: 110-6.

20 En otra modalidad, los anticuerpos de la invención pueden ponerse a prueba inicialmente para la actividad de unión asociada con su uso terapéutico o de diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, pueden ponerse a prueba las composiciones de la invención usando análisis citométrico de flujo.

La presente descripción provee además el uso de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo como un medicamento y el uso de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno mediado por OX40. En otra
5 modalidad, la presente descripción provee el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo para su uso como un medicamento. Provisto también por la presente descripción, es el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo para su uso en un método para tratar un trastorno mediado por OX40. Los trastornos mediados por OX40 son los descritos anteriormente. El
10 anticuerpo antagonista de la presente invención puede ser particularmente útil para tratar trastornos mediados por OX40, independientemente del estado co-estimulador de OX40 de un paciente. En una modalidad preferida, el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo puede usarse para tratar un trastorno mediado por OX40, en donde un paciente expresa un bajo nivel de
15 OX40.

Como se describió anteriormente, los anticuerpos de OX40 antagonistas de la invención pueden ser co-administrados con uno o más de otros agentes terapéuticos, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede ser enlazado al
20 agente (como un inmunoconjugado como se describió anteriormente), o puede administrarse por separado del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o concurrentemente con el agente, o puede ser co-administrado con otras

terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anti-cáncer, por ejemplo, radiación.

Para la administración del anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0.0001 a 100 mg/kg, y más usualmente de 0.01 a 10 mg/kg, del peso corporal del hospedero. Un ejemplo de régimen de tratamiento causa la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez por mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. El anticuerpo se administra usualmente en ocasiones múltiples. Intervalos entre las dosificaciones individuales pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada tres meses o anualmente. Los intervalos pueden ser también irregulares, según se indica midiendo los niveles del anticuerpo en sangre con el antígeno objetivo en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración del anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml, y en algunos métodos aproximadamente 25-300 µg/ml. En forma alternativa, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían, dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. La dosificación y la frecuencia de la administración pueden variar, dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, una dosificación relativamente baja se administra a intervalos relativamente infrecuentes durante un período largo. Algunos pacientes continúan recibiendo el tratamiento por el resto de su

vida. En aplicaciones terapéuticas, una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos se requiere a veces hasta que la progresión de la enfermedad sea reducida o terminada.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos, es decir, el anticuerpo en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, pueden hacerse variar hasta que se obtenga una cantidad del ingrediente activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin que sea tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención usadas, la vía de administración, la hora de administración, la velocidad de excreción del anticuerpo particular que está siendo usado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares usadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica previa del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en las áreas médicas.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un anticuerpo de OX40 de la invención, resulta de preferencia en una disminución en la severidad de los síntomas de la enfermedad, un incremento en la frecuencia y la duración de los períodos libres de los síntomas de la enfermedad, y/o una prevención de deterioro o incapacidad debido a la aflicción de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para el tratamiento de un trastorno mediado

116

por OX40 puede evaluarse en un sistema de modelo animal profético de eficacia en humanos. En forma alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular, y dicha inhibición puede medirse *in vitro* mediante pruebas conocidas por el profesional médico experto. El experto en la técnica sería capaz de determinar dichas cantidades con base en factores tales como la estatura del sujeto, la severidad de los síntomas del sujeto, y la composición o vía de administración particular seleccionada.

El anticuerpo o la composición de la presente invención pueden administrarse por medio de una o más vías de administración usando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como el experto en la técnica apreciará, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Vías de administración preferidas incluyen las vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión. Vías de administración más preferidas son las vías intravenosa o subcutánea. La frase "administración parenteral", como se usa en la presente, significa modos de administración diferentes de la administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluyen, sin limitación, la administración intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal y por

infusión. En forma alternativa, un anticuerpo de la invención puede administrarse por medio de una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o por mucosas, por ejemplo, intranasalmente, oralmente, vaginalmente, rectalmente, sublingualmente o

5 tópicamente.

Artículo de fabricación y kit

En otra modalidad de la descripción, se provee un artículo de fabricación que comprende el anticuerpo antagonista o fragmento del mismo,

10 la composición o el inmunoconjugado de la invención, para el tratamiento de un trastorno mediado por OX40. El artículo de fabricación puede comprender un contenedor y una etiqueta o inserción del empaque sobre o asociado con el contenedor. Contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, matraces, viales o jeringas. Los contenedores pueden formarse de una variedad de

15 materiales tales como vidrio o plástico. El contenedor contiene una composición que puede ser efectiva para tratar la condición, y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón horadable por una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición

20 puede ser el anticuerpo antagonista descrito en la presente. La etiqueta o la inserción del empaque pueden indicar que la composición puede usarse para tratar la condición de elección, tal como cáncer. En una modalidad, la etiqueta o inserción del empaque puede indicar que la composición que comprende el

anticuerpo antagonista puede usarse para tratar un trastorno mediado por OX40.

Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer contenedor con una composición contenida en el mismo, en donde la
5 composición comprende el anticuerpo antagonista en el mismo, y (b) un segundo contenedor con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un agente terapéutico diferente del anticuerpo antagonista. El artículo de fabricación en esta modalidad de la descripción puede comprender además una inserción del empaque que indica que la
10 primera y segunda composiciones pueden usarse en combinación para tratar una enfermedad o trastorno mediado por OX40. Dicho agente terapéutico puede ser cualquiera de las terapias auxiliares descritas en la sección anterior (por ejemplo, un agente trombolítico, un agente anti-plaquetario, un agente quimioterapéutico, un agente anti-angiogénico, un compuesto anti-hormonal,
15 un cardioprotector y/o un regulador de la función inmune en un mamífero, incluyendo una citocina). En forma alternativa, o además, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) contenedor que comprende un regulador de pH farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina regulada en su pH con
20 fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros reguladores de pH, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

También dentro del alcance de la presente invención están kits que comprenden el anticuerpo, las composiciones o los inmunoconjugados de la invención, e instrucciones para su uso. El kit puede contener además uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, y uno o más anticuerpos antagonistas adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo antagonista que tenga una actividad complementaria y que se una a un epítipo en el antígeno de OX40 distinto del primer anticuerpo antagonista).

Sin más descripción, se cree que el experto en la técnica puede, usando la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos, producir y usar los agentes de la presente descripción y practicar los métodos reclamados. Los siguientes ejemplos de trabajo se proveen para facilitar la práctica de la presente descripción, y de ninguna manera se considerará que limitan el resto de la descripción.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Generación y selección de anticuerpos de OX40 anti-humano de ratón

Para producir la proteína OX40-Fc recombinante de humano, un ADNc para TNFRSF4 de humano se adquirió de imaGenes (clon número: RZPDB737H0329D; Berlín, Alemania). Este ADNc se usó como molde para

amplificar por PCR la región codificante de ADN del dominio extracelular TNFRSF4 de humano (SEQ ID NO: 11). En una reacción de PCR separada, la región Fc de una IgG1 de humano (posiciones de EU 223-451) se amplificó mediante PCR añadiendo un enlazador 5' GSGGG y un enlazador 3' SA-6xHis y sitios de restricción para la clonación. Los dos productos resultantes se fusionaron entonces usando PCR de extensión por traslape con los iniciadores de flanqueo, añadiendo sitios de restricción para la clonación subsiguiente en un vector de expresión modificado de mamífero basado en el plásmido pcDNA3.1(-) de Invitrogen (Invitrogen AG, Basel, Suiza, No. de catálogo V795-20), que contiene al promotor del CMV de humano con el fragmento aceptor donador de Ig (primer intrón) descrito en la patente de los Estados Unidos 5924939, la secuencia OriP (Koons MD *et al.*, (2001) J Virol. 75(22): 10582-92), el intensificador de SV40 y la poliA del SV40 fusionada al terminador de gastrina como es descrito por Kim D. *et al.*, (2003) Biotechnol. Prog. 19(5): 1620-2. Este plásmido recombinante permitió la expresión de la proteína de fusión de Fc – dominio extracelular TNFRSF4 de humano en células de mamífero con secreción en el medio de cultivo de células dirigida por el péptido de señal nativo de la proteína TNFRSF4 de humano. Para la producción de la proteína recombinante, el vector recombinante mencionado anteriormente fue transfectado en células HEK 293 adaptadas a la suspensión (No. de la ATCC CRL 1573) usando el reactivo de transfección jetPEI™ (Polyplus-transfection S. A., Estrasburgo, Francia; distribuidor: Brunschwig, Basel, Suiza). El sobrenadante del cultivo de células se colectó después de

cinco días y se purificó adicionalmente usando una columna de purificación por afinidad de proteína A (columna HiTrap de proteína A sepharose; GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza) operada en un sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza).

- 5 Para producir la proteína OX40-his recombinante de humano, la región extracelular de TNFRSF4 de humano (SEQ ID NO: 11) fue amplificada mediante PCR añadiendo un enlazador 3' GSG-6xHis y sitios de restricción para la clonación. El producto de PCR fue clonado subsiguientemente en el plásmido pcDNA3.1(-) modificado descrito anteriormente. Este plásmido
- 10 recombinante permitió la expresión de la proteína OX40-his de humano en células de mamífero con secreción en el medio de cultivo de células dirigida por el péptido de señal nativo de TNFRSF4 de humano. Para la producción de la proteína, el vector recombinante fue transfectado en células HEK 293 adaptadas de la suspensión (No. de la ATCC CRL 1573) usando el reactivo
- 15 de transfección jetPEI™ (Polyplus-transfection S. A., Estrasburgo, Francia; distribuidor: Brunschwig, Basel, Suiza). El sobrenadante del cultivo de células se colectó cinco días después de la transfección y se purificó usando una columna de purificación por afinidad de Ni²⁺-NTA (columna HiTrap de Ni²⁺-NTA sepharose; GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza) operada en
- 20 un sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza). Se encontró que las proteínas OX40-Fc y OX40-his recombinantes de humano son 95% puras según se juzgó mediante SDS-PAGE, y adicionalmente

reguladas en su pH intercambiadas en solución salina regulada en su pH con fosfato (PBS) antes de su uso.

La proteína OX40-Fc recombinante de humano disuelta en PBS se mezcló con un volumen igual de adyuvante Stimune (Prionics, Suiza, ref: 7925000), y se preparó una emulsión. La emulsión se transfirió a jeringas de insulina de 0.5 mL (BD Pharmingen, Allschwil, Suiza), y se inmunizó subcutáneamente a animales BALB/c (Harlan, Los Países Bajos) en los cojinetes de las patas traseras, la base de la cola y el cuello con 50 µg de la proteína emulsificada. Se repitió la inmunización dos semanas después con la misma cantidad de antígeno y la misma vía de inyección.

La presencia de anticuerpos de OX40 anti-humano circulantes en el suero de los ratones inmunizados se evaluó mediante ELISA directa usando placas recubiertas con la proteína OX40-his recombinante de humano. Una dilución en serie (de 1:10⁰ a 1:10⁹) de los diferentes sueros de los ratones se añadió a las placas, y se detectaron los anticuerpos unidos usando una molécula entera H+L anti-ratón de cabra-HRP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza). Un refuerzo subcutáneo final con 50 µg de antígeno sin adyuvante se llevó a cabo en los animales que exhibieron el mejor título del suero de IgG de OX40 anti-humano tres días antes del sacrificio.

Se sometió a los animales a eutanasia, y los nódulos linfáticos inguinales, axilares, braquiales, poplíteos y ciáticos se colectaron para preparar una suspensión de células individuales perturbando la arquitectura de los nódulos linfáticos con dos agujas 25G en una solución de

desoxirribonucleasa (Roche Diagnostics (Schweiz) AG, Rotkreuz, Suiza) y colagenasa (Roche Diagnostics (Schweiz) AG, Rotkreuz, Suiza). Suspensiones de células individuales fueron fusionadas con una línea de células de mieloma X63AG8.653 (línea de células de mieloma de ratones BALB/c; número de acceso de la ATCC: CRL 1580; Kearney JF *et al.*, (1979) J. Immunol. 123(4): 1548-1550) a una relación de 7:1 (miembro de fusión a células cosechadas de los nódulos linfáticos) con polietilenglicol 1500 (Roche Diagnostics (Schweiz) AG, Rotkreuz, Suiza). Las células fusionadas se sembraron en placas de fondo plano de 96 cavidades que contenían macrófagos de ratón en medio DMEM-10 (Invitrogen AG, Basel, Suiza) complementado con suero de bovino fetal (FBS, PAA Laboratories, Pasching, Austria) a 10%, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml (Biochrom AG, Alemania) de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (Biochrom AG, Alemania), HEPES 10 mM (Invitrogen AG, Basel, Suiza), β-mercaptoetanol 50 µM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza), HAT (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) y factor de crecimiento a 1% (Hybridokine, Interchim/Uptima, Montlucon, Francia).

Aproximadamente 800 cavidades de las fusiones se seleccionaron mediante ELISA para la presencia de IgG de ratón que reconoció a OX40 de humano y bloqueó la unión del OX40L de humano en su receptor. Las células positivas se expandieron y se sometieron a dos rondas de subclonación. Las células se colectaron y las cadenas pesada y ligera fueron clonadas y secuenciadas.

EJEMPLO 2

Clonación y secuenciación de las cadenas VH y VL de los anticuerpos

anti-OX40 de células de hibridoma

5 Por cada hibridoma positivamente seleccionado, se preparó ARN total, el cual fue transcrito en forma inversa en ADNc, y los genes de VH y VL fueron amplificados respectivamente mediante PCR. Estos productos de PCR fueron ligados en un vector de rescate (vector pDrive; QIAGEN AG, Hombrechtikon, Suiza; No. de catálogo 231124), permitiendo la secuenciación

10 del ADN de los productos de PCR individuales y la determinación de monoclonalidad o poli-clonalidad de los hibridomas seleccionados. Este vector permitió la selección de azul/blanco en placas de agar de LB que contenían IPTG y X-gal (las colonias sin inserción eran azules debido a la degradación de la X-gal por la combinación LacZ α -péptido). Se prepararon plásmidos

15 recombinantes de los clones bacterianos positivos (blancos), y se secuenciaron usando iniciadores de secuenciación de ADN estándar para la estructura de base del vector (M13 inverso, M13 delantero, T7 o SP6). Las secuencias de ADN fueron finalmente subclonadas en un vector de expresión para la expresión recombinante del anticuerpo de interés en células de

20 mamífero.

195

Aislamiento de ARN

Se aisló ARN total de $2 \cdot 10^6$ células usando el mini kit RNeasy de QIAGEN (QIAGEN AG, Hombrechtikon, Suiza; No. de catálogo 74106), de acuerdo con el protocolo del fabricante; las muestras se cuantificaron usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (WITEC AG, Littau, Suiza).

RT-PCR de un paso

Las preparaciones de ARN total descritas anteriormente fueron adicionalmente transcritas en forma inversa en ADNc, y los fragmentos de VH y VL fueron amplificados mediante PCR usando dos mezclas diferentes de iniciadores degenerados, cada una permitiendo la recuperación de todas las diferentes subfamilias de los fragmentos variables de la cadena pesada de inmunoglobulina y las regiones de la unión variables de la cadena pesada de ratón o la recuperación de todos los fragmentos variables kappa de la cadena ligera de inmunoglobulina y las regiones de la unión kappa de la cadena ligera variable de ratón. Los iniciadores usados para la transcripción inversa y la amplificación fueron sintetizados por Microsynth (Balgach, Suiza), y fueron purificados mediante CLAR (cuadros 1-4). Tanto la transcripción inversa como la amplificación por PCR se llevaron a cabo simultáneamente usando el kit de RT-PCR de un paso de QIAGEN (QIAGEN AG, Hombrechtikon, Suiza; No. de catálogo 210212). Puesto que la técnica usó iniciadores específicos, cada muestra de ARNm se trató entonces por duplicado permitiendo la transcripción inversa individual y la amplificación de los fragmentos de VH o

VL. 2 µg de ARN total disueltos en agua libre de ribonucleasa hasta un volumen final de 30 µl se mezclaron con: 10 µl de una solución de repuesto 5x de regulador de pH para RT-PCR de un paso de QIAGEN, 2 µl de una mezcla de dNTPs a una concentración de 10 mM, y 3 µl de mezcla de iniciadores a una concentración de 10 µM y 2 µl de mezcla de enzimas para RT-PCR de un paso de QIAGEN. La mezcla final se puso entonces en un tubo de PCR, y se ciclizó en un termociclizador de PCR (BioRad iCycler versión 4.006, Bio-Rad Laboratories AG, Reinach, Suiza) usando los siguientes valores:

	30 minutos a 50°C
10	15 minutos a 95°C
	40 ciclos: 30 segundos a 94°C
	30 segundos a 55°C
	1 minuto a 72°C
	10 minutos a 72°C
15	Mantener a 4°C

Clonación en pDrive

Se hicieron correr productos de PCR en geles de agarosa a 2%. Después de la electroforesis del ADN, los fragmentos interés (~450 pb) se separaron de los geles de agarosa, y se extrajeron adicionalmente usando el kit NucleoSpin Extract II 250 de Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, Oensingen, Suiza; No. de catálogo 740609.250). Para la secuenciación del ADN, los productos de PCR extraídos fueron clonados en el vector de rescate

descrito anteriormente (vector pDrive, QIAGEN AG, Hombrechtikon, Suiza; No. de catálogo 231124) y transformados en la cepa TOP10 de *E. coli* (Invitrogen AG, Basel, Suiza; No. de catálogo C404006).

5 Extracción miniprep

Se cultivaron colonias positivas durante la noche a 37°C (agitación, 250 RPM) en 1.5 ml de medio de Luria Bertani (LB) complementado con 100 µg/ml de ampicilina, sembradas en placas de bloqueo de cavidades cuadradas de Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, Oensingen, Suiza; No. de catálogo 740488.24). Al día siguiente, se hicieron extracciones miniprep de ADN usando el kit de plásmidos NucleoSpin Multi-8 (Macherey-Nagel, Oensingen, Suiza; No. de catálogo 740620.5).

Secuenciación y análisis de la secuencia

15 Las muestras se enviaron para la secuenciación del ADN a la compañía de servicios de secuenciación de ADN Fasteris (Plan-les-Ouates, Suiza). Se usaron los iniciadores estándar: M13 inverso, M13 delantero, T7, SP6 (cuadro 5). Para analizar las secuencias de ADN, se usaron el administrador 9 de clones edición profesional (Scientific & Educational Software, NC, USA) y el editor de la alineación de secuencias BioEdit (Hall, 20 TA (1999) Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98).

Clonación del vector de expresión para la expresión de anticuerpos quiméricos recombinantes

Para la expresión recombinante en células de mamífero, los fragmentos de VH y VL aislados de murino fueron formateados como

5 inmunoglobulinas quiméricas usando métodos de PCR basados en el ensamble. Estos anticuerpos quiméricos consisten de una cadena pesada en donde el dominio variable de cadena pesada de murino es fusionado con los dominios constantes de cadena pesada de IgG1 de humano (regiones $\gamma 1$, gozne, $\gamma 2$ y $\gamma 3$) y una cadena ligera en donde el dominio variable de la cadena

10 ligera de murino es fusionado con un dominio constante kappa de humano ($C\kappa$). Las regiones constante de humano y variable de murino ensambladas mediante PCR fueron clonadas posteriormente en un vector de expresión modificado de mamífero basado en el vector pcDNA3.1(-) modificado de Invitrogen mencionado en el ejemplo 1, con la diferencia de que se usó un

15 péptido guía kappa de cadena ligera de inmunoglobulina de humano para dirigir la secreción de proteínas. Para la producción de proteínas de los candidatos de inmunoglobulina, cantidades iguales de ADN del vector de cadena ligera y pesada fueron co-transfectadas en células HEK-293 (No. de la ATCC: CRL-1573) adaptadas a la suspensión. El sobrenadante del cultivo de

20 células se colectó después de cinco días y se purificó usando una columna de purificación por afinidad de proteína A (columna HiTrap de proteína A sepharose) operada en un sistema ÄKTA FPLC (ambos de GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza).

CUADRO 1

Mezcla de iniciadores inversos para la región VH

	GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTR MAG CTT CAG GAG TC
	GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTB CAG CTB CAG CAG TC
	GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTG CAG CTG AAG SAR TC
5	GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTC CAR CTG CAA CAR TC
	GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAG CTB CAG CAR TC
	GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAR CTG CAG CAR TC
	GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAC GTG AAG CAR TC
	GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAS STG GTG GAR TC
	GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAV GTG AWG STG GTG GAG TC
10	GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAG STG GTG GAR TC
	GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTG CAM CTG GTG GAR TC
	GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG CTG ATG GAR TC
	GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAR CTT GTT GAR TC
	GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAR GTR AAG CTT CTC GAR TC
	GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAA GTG AAR STT GAG GAR TC
	GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTT ACT CTR AAA SAR TC
15	GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAA CTV CAG CAR CC
	GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAT GTG AAC TTG GAA SAR TC
	GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG GTC ATC GAR TC

30

CUADRO 2

Mezcla de iniciadores delanteros para la región VH

5 CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA AAC GGT GAC CGT GGT
CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT
CCTCCACCACTCGAGCC CGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT
CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT

CUADRO 3

Mezcla de iniciadores inversos para la región VL

10 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATC CAG CTG ACT CAG CC
GGCGGTGGC GCT AGC CAA ATT GTT CTC ACC CAG TC
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG MTM ACT CAG TC
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG YTR ACA CAG TC
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTR ATG ACM CAG TC
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT MAG ATR AMC CAG TC
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT CAG ATG AYD CAG TC
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATY CAG ATG ACA CAG AC
15 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTT CTC AWC CAG TC
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GWG CTS ACC CAA TC
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT STR ATG ACC CAR TC
GGCGGTGGC GCT AGC GAY RTT KTG ATG ACC CAR AC
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG ATG ACB CAG KC
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATA ACY CAG GA
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACC CAG WT
20 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACA CAA CC
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT TTG CTG ACT CAG TC
GGCGGTGGC GCT AGC GAA ACA ACT GTG ACC CAG TC
GGCGGTGGCGCT AGC GAA AAT GTK CTS ACC CAG TC
GGCGGTGGCGCT AGC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TC

CUADRO 4

Mezcla de iniciadores delanteros para la región VL

5 ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT KAT TTC CAG CTT GG
 ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT TAT TTC CAA CTT TG
 ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT CAG CTC CAG CTT GG
 ATGCTGAC GC GGC CGC ACC TAG GAC AGT CAG TTT GG

CUADRO 5

Iniciadores de secuenciación

	M13 delantero	GTAAAACGACGGCCAGT
10	M13 inverso	AACAGCTATGACCATG
	T7	TAATACGACTCACTATAGG
	SP6	GATTTAGGTGACACTATAG

EJEMPLO 3

15 **Caracterización biológica de los anticuerpos de OX40 anti-humano**

ELISA de detección de anticuerpos específicos de OX40

20 Los títulos de los anticuerpos, la especificidad y producción de
 hibridomas y los candidatos de anticuerpos recombinantes, se determinaron
 mediante una ELISA directa. En resumen, se recubrieron placas de microtítulo
 de 96 cavidades (Costar USA, distribuidor VWR AG, Nyon, Suiza) con 100 µl
 de OX40-his recombinante de humano a 2 µg/ml en PBS (véase el ejemplo 1
 para la generación de la proteína OX40-his). Las placas se incubaron durante

la noche a 4°C, y entonces fueron bloqueadas con PBS, usando BSA (albúmina de suero de bovino) a 2% (PAA Laboratories, Pasching, Austria) a temperatura ambiente (RT) por una hora. La solución de bloqueo se removió, y se añadieron los sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos purificados.

5 Las placas se incubaron a RT por 30 minutos, entonces se lavaron nueve veces con PBS, usando Tween-20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) a 0.01%, y se añadió un anticuerpo de detección H+L anti-ratón de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) a una dilución de 1:1000. Para detectar los

10 anticuerpos quiméricos recombinantes (véase el ejemplo 2) que poseen un Fc de humano, se usó un anticuerpo de IgG anti-humano de conejo marcado con HRP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) a una dilución de 1:1000 como el anticuerpo de detección. Las placas se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente (RT), se lavaron nueve veces con PBS usando Tween-

15 20 a 0.01%, y el substrato de TMB (Bio-rad Laboratories AG, Reinach, Suiza) se añadió a las placas, y la reacción se interrumpió después de seis minutos añadiendo H₂SO₄. Entonces se leyó la absorbancia a 450 nm mediante un lector de microplacas (Biotek, USA; distribuidor: WITTEC AG, Littau, Suiza). La figura 1A muestra que el anticuerpo 1D4 quimérico y el anticuerpo 2F8

20 quimérico reconocen a la proteína recubierta con OX40-his.

ELISA de bloqueo de OX40L

Se generó la proteína del ligando de OX40 recombinante de humano (OX40L), como sigue: el ADNc para TNFSF4 de humano (número de clon: IOH46203) se adquirió de imaGenes (Berlín, Alemania), y la porción
5 extracelular (aminoácidos 51-183) del ligando TNFSF4 de humano (numeración de acuerdo con la secuencia de Uniprot Q6FGS4) se amplificó con sitios de restricción de flanco. El producto de PCR resultante que abarca un enlazador de ASA y una secuencia de marcador 8-His en su extremo 5' fue clonado posteriormente en una versión modificada del vector
10 pREP4 de Invitrogen (Invitrogen AG, Basel, Suiza) que posee un promotor del CMV, una poliadenilación de hormona de crecimiento de bovino y el péptido guía VJ2C de murino que dirige la secreción de la proteína recombinante. Para la producción de la proteína recombinante, el vector recombinante fue transfectado en células HEK 293 adaptadas a la suspensión (No. de la ATCC
15 CRL 1573) usando el reactivo de transfección jetPEI™ (Polyplus-transfection S. A., Estrasburgo, Francia; distribuidor: Brunschwig, Basel, Suiza). El sobrenadante del cultivo de células se colectó después de cinco días y se purificó usando una columna de purificación por afinidad de proteína A (columna HiTrap de proteína A sepharose; GE Healthcare Europe GmbH, Glatbrugg, Suiza) operada en un sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare Europe
20 GmbH, Glatbrugg, Suiza).

Para determinar si los anticuerpos anti-OX40 generados pueden bloquear la unión de OX40L al receptor de OX40, se desarrolló una ELISA de

bloqueo. Se recubrieron placas de microtítulo de noventa y seis cavidades (Costar, USA; distribuidor VWR AG, Nyon, Suiza) con 100 µl de OX40-Fc recombinante de humano (véase el ejemplo 1) a 2 µg/ml en PBS. Las placas se incubaron durante la noche a 4°C, y entonces fueron bloqueadas con PBS, usando BSA a 2% a RT por una hora. La solución de bloqueo se removió, y los sobrenadantes de hibridomas o los anticuerpos purificados se añadieron a la placa. Cinco minutos después, se añadieron a cada cavidad 50 µl de OX40L recombinante biotinilado de humano a 0.04 mg/ml. Las placas se incubaron a RT por 60 minutos, entonces se lavaron nueve veces con PBS, usando Tween-20 a 0.01%, y se añadió HRP-estreptavidina (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) a una dilución de 1:2000. Las placas se incubaron por 30 minutos a RT, se lavaron 9 veces con PBS, usando Tween-20 a 0.01%, y se añadió el substrato de TMB (Bio-rad Laboratories AG, Reinach, Suiza) a las placas y la reacción se interrumpió después de 6 minutos añadiendo H₂SO₄. Se leyó entonces la absorbancia a 450 nm mediante un lector de microplacas (Biotek, USA; distribuidor: WITTEC AG, Littau, Suiza). La figura 1B muestra que el anticuerpo 1D4 quimérico es capaz de bloquear la interacción entre OX40 y OX40L en una manera dependiente de la dosis, mientras que el anticuerpo 2F8 quimérico no es capaz de bloquear la interacción entre OX40 y OX40L.

Reacción mixta de linfocitos (MLR) de humano

Se colectó sangre de dos diferentes donadores en tres S-Monovette de 10 mL con citrato como un anticoagulante (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). Las células del donador número 1 se usaron como células efectoras, mientras que las células del donador número 2 se usaron como células objetivo. Las PBMCs (células mononucleares de sangre periférica) de los 2 donadores se purificaron usando tubos Blood-Sep-Filter de 50 mL (distribuidor: Brunschwig, Basel, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron 2 veces con medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI, PAA Laboratories, Pasching, Austria) sin FBS. Las células objetivo se incubaron con 50 µg/ml de mitomicina C (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) por 30 minutos a 37°C. Las células se lavaron entonces 3 veces con RPMI sin FBS y se resuspendieron a 1×10^6 células/mL en RPMI, FBS a 10% (PAA Laboratories, Pasching, Austria), L-glutamina 2 mM (Lonza, Leuven, Bélgica), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Biochrom AG, Berlín, Alemania). En microplacas de fondo en U de 96 cavidades (TPP, Trasadingen, Suiza), 50,000 células objetivo y 80,000 células efectoras se distribuyeron en un volumen final de 100 µl por cada cavidad. Cien µl de diluciones del anticuerpo se añadieron a las cavidades. Las placas se incubaron por 7 días a 37°C en una incubadora de CO₂ a 5%. Siete días después del inicio de la MLR, las células fueron pulsadas con 0.5 µCi de timidina tritiada (Perkin Elmer). 18 horas después de la pulsación, las células se cosecharon y se cuantificó la radiactividad

incorporada en un contador Wallac beta. La figura 2 muestra que el anticuerpo 1D4 quimérico es capaz de bloquear la MLR en una manera dependiente de la dosis a un mayor grado que el control positivo.

5

EJEMPLO 4

Unión de los anticuerpos de OX40 anti-humano en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) activadas de humano y otra especie animal mediante citometría de flujo

10

Células humanas

Se colectaron filtros que contenían leucocitos humanos del Blood Collection Center de La Chaux-de-Fonds, Suiza (Centre de Transfusion Sanguine et Laboratoire de Sérologie, rue Sophie-Mairet 29, CH-2300). Las células se removieron de los filtros mediante contraflujo con 60 mL de PBS que contenía 10 U/mL de liquemin (Drossapharm AG, Lucern, Suiza). Entonces las PBMCs se purificaron con tubos Blood-Sep-Filter de 50 mL (distribuidor: Brunschwig, Basel, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron 3 veces con medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI, PAA Laboratories, Pasching, Austria) con FBS (PAA Laboratories, Pasching, Austria). Las células se resuspendieron a 3×10^6 células/ml en RPMI, FBS a 10% (PAA Laboratories, Pasching, Austria), ultraglutamina 2 mM (Lonza, Leuven, Bélgica), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (Biochrom AG, Berlín, Alemania), 10 µg/ml de

20

fitohemaglutinina (PHA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) + 100 U/mL de IL-2 rHu (Proleukin, Novartis, Basel, Suiza) en una placa de 24 cavidades (TPP, Trasadingen, Suiza). Cuarenta y ocho horas después, las células se colectaron y se analizaron mediante citometría de flujo como se describió anteriormente.

Células HPB-ALL (línea de células T de leucemia linfoide aguda, de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania) se cultivaron en RPMI, FBS a 10%. Se distribuyeron 2×10^5 células en una placa de fondo en V de 96 cavidades (TPP, Trasadingen, Suiza), y se centrifugaron por tres minutos a 1300 rpm; los sobrenadantes se desecharon, las células se colectaron y se analizaron mediante citometría de flujo como se describió anteriormente.

Las PBMCs y las células HPB-ALL preparadas como se describió anteriormente se resuspendieron en 50 μ l de regulador de pH para FACS (PBS, FBS a 2%, Versene a 10% (Invitrogen, USA) con 5 μ g/mL de anticuerpo 1D4 quimérico o 5 μ g/mL de un control de isotipos apropiado o 20 μ l de un anticuerpo de OX40 anti-humano comercial marcado con PE (clon L106, BD Biosciences, Allschwil, Suiza). Las células se incubaron por 30 minutos sobre hielo, se lavaron dos veces y se resuspendieron en 50 μ l de regulador de pH para FACS. Se usó una IgG anti-humano-ficoeritrina-PE (BD Biosciences, Allschwil, Suiza) diluida 1/200 para detectar el anticuerpo 1D4 quimérico y el anticuerpo control de isotipos. Las células se incubaron por 15 minutos sobre hielo, se lavaron una vez, se resuspendieron en 400 μ l de

regulador de pH para FACS y se analizaron en el instrumento para FACS (Cyan, Beckman Coulter International S. A., Nyon, Suiza).

Células primarias de monos Cynomolgus

- 5 Sangre entera de monos Cynomolgus (obtenida del Profesor Eric Rouiller, Laboratory of Neurophysiology, University of Fribourg, Fribourg, Suiza), se colectó en tubos de citrato (BD Biosciences, Allschwil, Suiza). Dos mL de PBS se mezclaron con 3 mL de sangre, y la mezcla se estratificó en la parte de arriba de 10 ml de una mezcla 85:15 de Ficoll: PBS (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza). Las muestras se centrifugaron por 20 minutos a temperatura ambiente sin interrupción. La capa de PBMCs se colectó y se lavó tres veces con PBS. Las células se resuspendieron a 3×10^6 células/mL en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, PAA Laboratories, Pasching, Austria), FBS a 10% (PAA Laboratories, Pasching, Austria), aminoácidos no esenciales (PAA Laboratories, Pasching, Austria) 15 piruvato de sodio 1 mM (PAA Laboratories, Pasching, Austria), ultraglutamina 2 mM (Lonza, Bélgica), 100 U/ml de penicilina (Biochrom AG, Alemania) y 100 µg/ml de estreptomicina (Biochrom AG, Alemania). Un mL de la suspensión de células se distribuyó en una placa de 24 cavidades (TPP, Trasadingen, Suiza), 20 y se añadieron 10 µg/ml de PHA (PHA/M, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) 100 U/mL de IL-2 rHu (Proleukin, Novartis, Basel, Suiza). Las células se incubaron por 50 horas a 37°C en una incubadora de CO₂ a 5%. Las PBMCs activadas se colectaron y se resuspendieron en PBS/FBS a 2.5%

(regulador de pH para FACS). Cincuenta mil células en 50 µl de regulador de pH para FACS se distribuyeron en una placa de fondo en V de 96 cavidades, y se añadieron anticuerpo 1D4 quimérico-OX40 anti-humano biotinilado o anticuerpo control de isotipos biotinilado u OX40 anti-humano comercial biotinilado producido en ovejas (BD Biosciences, Allschwil, Suiza) a las cavidades a 25 µg/ml. Las muestras se incubaron por 20 minutos sobre hielo y entonces las células se lavaron dos veces con regulador de pH para FACS, y entonces se incubaron con estreptavidina-PE (BD Biosciences, Allschwil, Suiza) a una dilución 1:20 por 15 minutos sobre hielo. Las células se lavaron una vez con regulador de pH para FACS, y entonces se resuspendieron en 300 µl de regulador de pH para FACS. Se añadió yoduro de propidio a un volumen de 2 µl (PI; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) en cada muestra para excluir las células muertas. Las células se analizaron mediante citometría de flujo (Cyan, Beckman Coulter International S.A., Nyon, Suiza).

Las figuras 3A y 3B muestran que el anticuerpo 1D4 quimérico es capaz de reconocer a OX40 expresada sobre la superficie de linfocitos activados de humano y de mono Cynomolgus, respectivamente; de esta manera, provee propiedades de reactividad cruzada altamente deseadas para el desarrollo de fármacos.

EJEMPLO 5

**Constantes de cinética de la afinidad de unión del anticuerpo 1D4
quimérico por el dominio extracelular del receptor de OX40 de humano
mediante resonancia de plasmones de superficie (SPR)**

5

Se midieron las constantes de cinética (KD) de la afinidad de unión en el anticuerpo capturado por proteína-A usando el dominio extracelular recombinante del receptor de OX40 de humano marcado con histidina como se describió en el ejemplo 1 como analito. Se hicieron mediciones en un BIAcore 2000 (GE Healthcare-BIAcore, Uppsala, Suecia) a temperatura ambiente, y se analizaron con el software BiaEvaluation (BIAcore; v4.1).

Un chip sensor de grado investigación CM5 (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza; BR-1000-14) fue activado inyectando 35 µl de una solución 1:1 de N-hidroxisulfosuccinimida (NHS)/clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) (v/v; magnitud de flujo de 5 µl/min; en las trayectorias de flujo 1 y 2). Se diluyó proteína A (ref. P7837; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) hasta una concentración final de 50 µg/ml en regulador de pH de acetato pH 4.5 (GE, BR-1003-50; una unidad de pH abajo del pI), y posteriormente se inmovilizó sobre el chip sensor CM5 previamente activado inyectando 35 µl en ambas trayectorias de flujo 1 y 2 (5 µl/min); esto correspondió a aproximadamente 1500 unidades de respuesta (RUs). El chip sensor de proteína A-CM5 se desactivó entonces inyectando 35

μl de solución de etanolamina (5 $\mu\text{l}/\text{min}$). Por último, se llevaron a cabo dos inyecciones de 10 μl de solución de glicina (GE, ref. BR-1003-54; 10 mM; pH 1.5) para liberar las moléculas de proteína A no entrelazadas.

Antes de las mediciones de la afinidad, una prueba de limitación de transferencia de masa se llevó a cabo inyectando una concentración fija de analito sobre una cantidad fija de anticuerpo capturado con proteína-A a diferentes magnitudes de flujo (5, 15, 30, 50, 75 $\mu\text{l}/\text{min}$ por 2 minutos). El análisis de las pendientes de la constante de velocidad de asociación a diferentes magnitudes de flujo, indicó la transferencia de masa.

Para las mediciones de la afinidad, el anticuerpo 1D4 quimérico almacenado en 1x regulador de pH de PBS se diluyó hasta una concentración final de 15 nM en regulador de pH de HBS-EP (GE, ref. BR-1001-88; Hepes 0.01 M, NaCl 0.15 M, EDTA 3 mM, agente tensoactivo P20 a 0.005%, pH 7.4). 10 μl de este repuesto diluido se inyectaron posteriormente en la trayectoria de flujo 2 del chip de proteína A CM5 (30 $\mu\text{l}/\text{min}$) hasta alcanzar las 200-250 RUs. Después de este paso de captura, el dominio extracelular recombinante del receptor de OX40 de humano marcado con histidina se inyectó a diferentes concentraciones (50 nM a 0.4 μM) en las trayectorias de flujo 1 y 2 (la trayectoria de flujo 1 siendo usada como referencia) a una magnitud de flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. Después de cada evento de unión, se regeneró la superficie con regulador de pH de glicina pH 1.5 inyectado por 1 minuto (10 $\mu\text{l}/\text{min}$).

Las mediciones (sensorgrama: fc2-fc1) se ajustaron mejor con un modelo de analito bivalente 2:1 con transferencia de masa. Para dar razón

de las variaciones experimentales en el anticuerpo capturado con proteína A al inicio de cada medición, el valor de $R_{\text{máx}}$ se ajustó a local en todos los valores. Los tiempos de disociación fueron de por lo menos 300 a 600 segundos. Se hicieron mediciones por duplicado e incluyeron muestras de concentración cero como referencia. El valor χ^2 representa la suma de las diferencias al cuadrado entre los datos experimentales y los datos de referencia en cada punto; mientras que las gráficas de los residuales indican la diferencia entre los datos experimentales y de referencia para punto en el ajuste. Tanto χ^2 como los valores residuales se usaron para evaluar la calidad de un ajuste entre los datos experimentales y los modelos de unión individuales.

Se hicieron mediciones por duplicado con el anticuerpo de OX40 anti-humano 1D4 quimérico capturado inmovilizado sobre el chip sensor de proteína A y el dominio extracelular recombinante del receptor de OX40 de humano marcado con histidina como analito. El valor de la KD estuvo entre 91 y 116 nM con valores de $\chi^2 < 1.25$.

EJEMPLO 6

Humanización del anticuerpo monoclonal de ratón 1D4

20

Se describe en la presente la humanización del anticuerpo 1D4 de ratón de OX40 anti-humano, incluyendo la selección de las estructuras aceptoras de humano, las mutaciones retrógradas y las mutaciones que

retienen y/o mejoran sustancialmente las propiedades de unión de las estructurasceptoras insertadas con CDR de humano.

Diseño de las regiones variables reformadas

- 5 Se usó acoplamiento de homología para elegir las estructurasceptoras de humano para injertar CDRs de 1D4. Pueden usarse bases de datos, por ejemplo, una base de datos de los genes variables de la línea germinal de los loci de inmunoglobulina de la base de datos de humano y de ratón (base de datos IMGT (sistema de información internacional
- 10 ImMunoGeneTics®; Lefranc MP *et al.*, (1999) *Nucleic Acids Res.* 27(1): 209-12; Ruiz M *et al.*, (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1): 219-21; Lefranc MP (2001) *Nucleic Acids Res.* 29(1): 207-9; Lefranc MP (2003) *Nucleic Acids Res.* 31(1): 307-10; Lefranc MP *et al.*, (2005) *Dev. Comp. Immunol.* 29(3): 185-203; Kaas Q *et al.*, (2007) *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 6(4): 253-64)
- 15 o la base de datos VBASE2 (Retter I *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Res.* 33, emisión de la base de datos D671-D674) o la base de datos de Kabat (Johnson G *et al.*, (2000) *Nucleic Acids Res.* 28: 214-218)) o publicaciones (véase, por ejemplo, Kabat EA *et al.*, citado anteriormente), para identificar las subfamilias de humano a las cuales las regiones V de cadena ligera y pesada
- 20 de murino pertenecen, y determinar la estructura de la línea germinal de humano de mejor ajuste para su uso como la molécula aceptora. La selección de las secuencias variables de cadena pesada y ligera (VH y VL) dentro de estas subfamilias que se usarán como el aceptor puede basarse en la

homología de secuencia y/o un acoplamiento de la estructura de las regiones CDR1 y CDR2 para ayudar a preservar la presentación relativa apropiada de las seis CDRs después del injerto.

Por ejemplo, el uso de la base de datos IMGT indica buena

5 homología entre la estructura del dominio variable de cadena pesada de 1D4 y los miembros de la subfamilia 2 del dominio variable de cadena pesada de humano. Se observaron las más altas homologías e identidades de ambas CDRs y secuencias de estructura para las secuencias de la línea germinal: IGHV 2-70*10 (SEQ ID NO: 19), IGHV2-70*01 (SEQ ID NO: 20), IGHV2-70*13

10 (SEQ ID NO: 21), IGHV2-5*09 (SEQ ID NO: 22) e IGHV2-70*11 (SEQ ID NO: 23), todas las cuales tienen identidad de secuencia arriba de 73% para la secuencia entera hasta CDR3. IGHV 2-70*10, IGHV2-70*01 e IGHV2-70*13 tienen una identidad de secuencia de 74%; mientras que IGHV2-5*09 e IGHV2-70*11 tienen una identidad de secuencia de 73.5% y 73%,

15 respectivamente.

Mediante el uso del mismo procedimiento, la secuencia del dominio variable de cadena ligera de 1D4 mostró buena homología con los miembros de la subfamilia 3 kappa del dominio variable de cadena ligera de humano. Se observaron las más altas homologías e identidades de ambas

20 CDRs y secuencias de estructura para las secuencias de la línea germinal: IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24) (65.3% de identidad), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25) (64.9% de identidad), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26) (64.9% de

identidad), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) (64.2% de identidad) e IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28) (62.5% de identidad).

Como punto de partida para el procedimiento de humanización, se seleccionaron los dominios variables IGHV 2-70*10 (SEQ ID NO: 19) e IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24) de humano como aceptores para las CDRs de 1D4. Se seleccionó a IGHV 2-70*10 sobre otros dominios variables de cadena pesada de humano por su homología superior con 1D4 en una región de su estructura.

Se preparó un primer anticuerpo humanizado de un isotipo gamma de humano (véase más adelante). El anticuerpo abarcó un dominio variable de cadena pesada híbrido de humano-ratón y un dominio variable de cadena ligera híbrido de humano-ratón. El dominio variable de cadena pesada híbrido se basó en el dominio variable de cadena pesada de humano IGHV 2-70*10, en donde las CDRs 1 y 2 de la línea germinal fueron reemplazadas respectivamente por las CDRs 1 y 2 de la cadena pesada de 1D4. Se identificó la secuencia del segmento JH de mejor coincidencia con la estructura aceptora de humano de las búsquedas de IMGT mencionadas anteriormente. La secuencia variable de cadena pesada híbrida de humano-ratón resultante que tiene las regiones de estructura IGHV 2-70*10 de humano, CDRs de 1D4 de ratón, y JH de mejor coincidencia con el aceptor de humano, es referida en la presente como el dominio variable de cadena pesada VH1 con SEQ ID NO: 29. De igual manera, el dominio variable de cadena ligera híbrido de humano-ratón usado para este primer anticuerpo

humanizado candidato tuvo las regiones de estructura IGKV3-11*01 de humano, CDRs de 1D4 de ratón y JK de mejor coincidencia con el aceptor de humano, y es referido en la presente como el dominio variable de cadena ligera VL1 con SEQ ID NO: 30. El primer anticuerpo humanizado que abarca a

5 VH1 y VL1 se abrevia en la presente como anticuerpo VH1/VL1.

Producción del primer prototipo de anticuerpo humanizado

Secuencias de ADN codificantes (moléculas de ADNc) para VH1 y VL1 fueron sintetizadas en un formato de scFv por GENEART AG

10 (Regensburg, Alemania), permitiendo de esta manera que una secuencia de ADN individual abarque ambos dominios variables (SEQ ID NO: 31). Moléculas de ADNc individuales del dominio variable se recuperaron de esta construcción de scFv mediante PCR, y se ensamblaron adicionalmente hacia el extremo 5' de sus secuencias de ADNc del dominio constante respectivas

15 usando técnicas de ensamble por PCR. Por último, las moléculas de ADNc de la cadena ligera y pesada completas fueron ligadas en vectores independientes que se basan en un vector pcDNA3.1 modificado (Invitrogen, CA, USA) que posee al promotor del CMV y una señal de poliadenilación de hormona de crecimiento de bovino. El vector específico de la cadena ligera

20 permitió la expresión de las cadenas ligeras de isotipo kappa de humano mediante la ligación del ADNc del dominio variable de cadena ligera de interés enfrente del ADNc del dominio constante de cadena ligera kappa usando los sitios de enzimas de restricción BamHI y BsiWI; mientras que se diseñó el

vector específico de la cadena pesada que permite la ligación del ADNc del dominio variable de cadena pesada de interés enfrente de la secuencia de ADNc que codifica para los dominios constantes CH1 IGHG1, región de gozne IGHG1, CH2 IGHG1 y CH3 IGHG1 usando los sitios de enzimas de restricción BamHI y Sall. En ambos vectores de expresión de cadena pesada y ligera, la secreción fue dirigida por el péptido guía VJ2C de ratón que contiene al sitio BamHI. El sitio de la enzima de restricción BsiWI se localiza en el dominio constante kappa; mientras que el sitio de la enzima de restricción Sall se encuentra en el dominio CH1 IGHG1.

El anticuerpo VH1/VL1 fue producido transitoriamente co-transfectando cantidades iguales de vectores de cadena ligera y pesada en células HEK293-EBNA1 adaptadas a la suspensión (No. de catálogo de la ATCC®: CRL-10852) usando polietilenimina (PEI, Sigma, Buchs, Suiza). Típicamente, 100 ml de células en suspensión a una densidad de 0.8-1.2 millones de células por ml son transfectadas con una mezcla de ADN-PEI que contiene 50 µg del vector de expresión que codifica para la cadena pesada y 50 µg del vector de expresión que codifica para la cadena ligera. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican para los genes de anticuerpo se introducen en las células hospederas, se producen anticuerpos cultivando adicionalmente las células por un período de 4 a 5 días para permitir la secreción en el medio de cultivo (EX-CELL 293, medio de células HEK293 libre de suero; Sigma, Buchs, Suiza) complementado con ácido plurónico a 0.1%, glutamina 4 mM y 0.25 µg/ml de geneticina).

El anticuerpo VH1/VL1 se purificó del sobrenadante libre de células usando medio streamline de proteína A recombinante (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza), y regulado en su pH se intercambió en solución salina de regulador de pH de fosfato antes de las pruebas. La unión a OX40 de humano se midió mediante SPR como se describió en el ejemplo 5.

Mutaciones retrógradas de estructuras injertadas de humano

Puesto que el injerto directo de CDRs del anticuerpo 1D4 de ratón llevó a un candidato que no tiene unión con OX40 de humano (cuadro 6 y figura 4), se inició la mutagénesis en donde residuos de humano son sustituidos por residuos de ratón. Este procedimiento se denomina mutación retrógrada, y es el procedimiento más impredecible en la humanización de los anticuerpos monoclonales. Necesita la identificación y la selección de residuos de estructura críticos del anticuerpo de ratón que necesitan ser retenidos para preservar la afinidad, mientras que al mismo tiempo reduce al mínimo la inmunogenicidad potencial en el anticuerpo humanizado. El cuadro 7, el cuadro 8 y la figura 5 muestran residuos (numeración de Kabat) que difieren entre las estructuras de anticuerpo de ratón y de humano. Los residuos que pueden afectar las conformaciones de las CDRs o el empaque del dominio intervariable son de particular interés, puesto que pueden tener el más alto impacto sobre la afinidad del anticuerpo.

Para identificar los residuos que pueden engastar la mayor parte de la conformación de la CDR y/o el empaque del dominio intervariable, se

calculó un modelo tridimensional para el par VH1-VL1 de los dominios variables usando el servidor de modelación de homología estructura SWISS-MODEL (Arnold K *et al.*, (2006) Bioinformatics, 22(2): 195-201; <http://swissmodel.expasy.org>) puesto en modo automatizado. El análisis del

5 modelo permitió la selección de un subgrupo de posiciones con base en su influencia putativa sobre las regiones de CDR y/o el empaque del dominio variable de cadena ligera y cadena pesada. Este subgrupo de posiciones consistió de las posiciones de la cadena pesada variable: 23, 35b, 48, 50, 60 y 62, así como las posiciones de la cadena ligera variable: 1, 33, 34, 46, 47, 54,

10 56 y 71 (numeración de Kabat). Además de estas mutaciones retrógradas, la posición Y31 de la cadena ligera encontrada en el anticuerpo VH1/VL1 fue deletada en algunos candidatos.

Se prepararon más candidatos humanizados con base en varias combinaciones de sustituciones de la cadena ligera y pesada en el contexto

15 de la secuencia del anticuerpo VH1/VL1 usando mutagénesis estándar y los métodos descritos anteriormente. Se pusieron a prueba candidatos de anticuerpo humanizados por su capacidad de unión mediante la SPR como se describió en el ejemplo 5.

Los rendimientos de producción y las propiedades de unión de

20 algunos de los anticuerpos humanizados con base en estas sustituciones individuales o combinación de sustituciones, se muestran en el cuadro 6. De los 28 anticuerpos mostrados, nueve candidatos no mostraron unión alguna con OX40 de humano, y otro grupo de nueve tuvo unión débil a deficiente. Los

anticuerpos humanizados basados en VL9 mostraron la unión más consistentemente a débilmente a OX40 de humano mediante SPR. Sólo dos anticuerpos, VH6/VL9 y VH7/VL9, mostraron buena unión a OX40 de humano. Ambos anticuerpos humanizados tuvieron mutaciones retrógradas en las

5 posiciones de la cadena pesada variable: 23, 35b, 50, 60 y 62 y las posiciones de la cadena ligera variable: 33, 34, 46, 47 y 71 (numeración de Kabat). Además de estas mutaciones retrógradas, VH6/VL9 y VH7/VL9 se beneficiaron de la remoción de la posición 31 de la cadena ligera. En forma sorprendente, VH7/VL9 tuvo afinidad mejorada por OX40 de humano sobre el

10 anticuerpo quimérico 1D4 y la variante VH6/VL9. Las afinidades de unión de estos anticuerpos humanizados se resumen en el cuadro 9.

Termoestabilidad de anticuerpos anti-OX40 humanizados
seleccionados mediante calorimetría de barrido diferencial

15 Las estabilidades térmicas de los anticuerpos humanizados se midieron usando calorimetría de barrido diferencial (DSC). Los perfiles de fusión de los anticuerpos monoclonales son característicos de sus isotipos (Garber E y Demarest SJ (2007) Biochem. Biophys. Res. Commun. 355: 751-7); sin embargo, la temperatura de fusión de punto medio del fragmento FAB

20 puede identificarse fácilmente incluso en el contexto de una IgG de longitud completa. Dicha fusión de punto medio de la porción FAB se usó para monitorear la estabilidad monoclonal de los anticuerpos humanizados.

Se llevaron a cabo mediciones calorimétricas en un microcalorímetro de barrido diferencial VP-DSC (MicroCal, Northampton, Reino Unido). El volumen de células fue de 0.128 ml, el régimen de calentamiento fue de 200°C/h, y el exceso de presión se mantuvo a 4.5695 kg/cm². Todos los anticuerpos se usaron a una concentración de 1 mg/ml en PBS (pH 7.4). Se estimó la capacidad térmica molar del anticuerpo por comparación con muestras duplicadas que contenían regulador de pH idéntico de las cuales se había omitido el anticuerpo. Las capacidades térmicas molares parciales y las curvas de fusión se analizaron usando procedimientos estándar. Los termogramas fueron corregidos en la línea base y la concentración normalizada antes de ser analizados adicionalmente usando un modelo Non-Two State en el software Origin v7.0.

El fragmento FAB de VH6/VL9 variante humanizado exhibió una transición individual a 76.3°C con una amplitud y forma consistentes con un despliegue cooperativo el cual se observa generalmente para un fragmento FAB compactamente plegado, indicando que el procedimiento de diseño fue exitoso en la retención de la estabilidad del fragmento FAB. En general, la variante humanizada mostró una buena estabilidad térmica.

152

CUADRO 6

Anticuerpos de OX40 anti-humano humanizados

	Variante de anticuerpo humanizado (IGHG1)	SEQ ID NOs	Mutaciones de VH/VL	Expresión transitoria (mg/l)	Unión a OX40 de humano
5	VH1/VL1	32,39	N.A./N.A.	40	No
	VH1/VL2	32,40	N.A./L33M	21	No
	VH1/VL3	32,41	N.A./F71Y	17	No
	VH2/VL1	33,39	T23S/N.A.	13	No
	VH2/VL2	33,40	T23S/L33M	17	No
10	VH2/VL3	33,41	T23S/F71Y	14	No
	VH3/VL1	34,39	R50H/N.A.	23	No
	VH3/VL2	34,40	R50H/L33M	22	No
	VH3/VL3	34,41	R50H/F71Y	18	No
	VH4/VL4	35,42	T23S-R50H/L33M-F71Y	15	Deficiente
15	VH4/VL9	35,47	T23S-R50H/deleción de Y31-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	3	Débil
	VH5/VL4	36,42	T23S-R50H-S60N-S62A/L33M-F71Y	15	Deficiente
	VH5/VL5	36,43	T23S-R50H-S60N-S62A/L33M-L46P-L47W-F71Y	2	Deficiente
	VH5/VL6	36,44	T23S-R50H-S60N-S62A/E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	2	Deficiente
	VH5/VL9	36,47	T23S-R50H-S60N-S62A/deleción de Y31-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	6	Débil
20	VH6/VL5	37,43	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/L33M-L46P-L47W-F71Y	0	N.D.
	VH6/VL6	37,44	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	0.5	N.D.
	VH6/VL7	37,45	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/deleción de Y31-L33M-F71Y	14	N.D.
	VH6/VL8	37,46	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/deleción de Y31-L33M-A34H-F71Y	7	N.D.

CUADRO 6 (CONTINUACIÓN)

5	VH6/VL9	37,47	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/delección de Y31-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	3.5	Buena
	VH6/VL10	37,48	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/delección de Y31-L33M-R54L-T56S-F71Y	0.5	N.D.
	VH6/VL11	37,49	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/delección de Y31-L33M-A34H-R54L-T56S-F71Y	5.5	N.D.
10	VH7/VL5	38,43	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/L33M-L46P-L47W-F71Y	1	N.D.
	VH7/VL6	38,44	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	1	N.D.
	VH7/VL7	38,45	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/delección de Y31-L33M-F71Y	1.5	Débil
	VH7/VL8	38,46	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/delección de Y31-L33M-A34H-F71Y	10	Débil
15	VH7/VL9	38,47	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/delección de Y31-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	3	Buena
	VH7/VL11	38,49	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/delección de Y31-L33M-A34H-R54L-T56S-F71Y	11.5	Débil/ Buena

154

CUADRO 7

Comparación de 1D4 y estructuras de IGHV 2-70*10 variables de cadena

pesada de aceptor de humano

5	Posición de Kabat	1D4	IGHV injertada con CDR 2-70*10
	10	G	A
	11	I	L
	12	L	V
	13	Q	K
	15	S	T
	19	S	T
	23	S	T
10	35b	G	S
	41	S	P
	44	G	A
	48	L	I
	50	H	R
	60	N	S
	62	A	S
	65	S	T
15	66	G	R
	79	F	V
	81	K	T
	82	I	M
	82a	A	T
	82b	S	N
	82c	Y	M
	84	T	P
20	85	T	V

CUADRO 8

Comparación de 1D4 y estructuras de IGKV 3-11*01 variables de cadena

ligera de aceptor de humano

5	Posición de Kabat	1D4	IGKV injertada con CDR 3-11*01
	1	Q	E
	10	I	T
	13	A	L
	18	K	R
	19	V	A
	21	M	L
	22	T	S
10	33	M	L
	34	H	A
	42	S	Q
	43	S	A
	45	K	R
	46	P	L
	47	W	L
	54	L	R
15	56	S	T
	58	V	I
	70	S	D
	71	Y	F
	72	S	T
	76	N	S
	77	R	S
	78	V	L
20	80	A	P
	83	A	F
	85	T	V

56

CUADRO 9

Características de la unión de anticuerpos anti OX40 quiméricos y humanizados seleccionados

5

Variantes humanizadas	SEQ ID NOs	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)	K _D (nM)
Quimera de 1D4	50,51	3.4x10 ⁴	3.08x10 ⁻³	91
VH6/VL9	37,47	3.54x10 ⁴	3.56x10 ⁻³	101
VH7/VL9	38,47	4.45x10 ⁴	3.12x10 ⁻³	70

EJEMPLO 7

Caracterización del epítoto de los anticuerpos anti-OX40 humanizados

10

Para caracterizar el epítoto de los anticuerpos anti-OX40 humanizados, el anticuerpo VH6/VL9 fue mapeado hacia un dominio definido de la región extracelular de OX40 de humano usando varias proteínas quiméricas OX40 de humano-rata.

15

Preparación de las proteínas quiméricas OX40 de humano-rata y

ELISA

20

Proteínas OX40 de rata y de humano-rata fueron formateadas como proteínas de fusión de Fc de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 1. Para la ELISA, se recubrieron proteínas OX40 a 2 µg/mL, en PBS, durante la noche a 4°C en placas de 96 cavidades de alta unión (Costar). Las placas fueron bloqueadas con PBS, albúmina de suero de bovino (BSA) a 2%, antes de la incubación con el anticuerpo VH6/VL9 o el anticuerpo control de

isotipos. Las placas se lavaron entonces y se incubaron con HRP específica del fragmento F(ab')₂ de Ig anti-humano de cabra (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Newmarket, Reino Unido). Después del lavado, las placas se incubaron con substrato TMB (Bio-Rad Laboratories AG, Reinach, Suiza) para
5 revelar la unión del anticuerpo. La reacción se interrumpió añadiendo H₂SO₄ 2M, y se leyó la densidad óptica a 450 nM (DO 450 nM) en un espectrofotómetro Synergy HT2 (Biotek, USA; distribuidor: WITTEC AG, Littau, Suiza).

10 Resultados

Sin tener en cuenta su origen, la región extracelular de OX40 se ha dividido en cuatro módulos estructurales referidos como dominios 1, 2, 3 y 4 (Compaan DM y Hymowitz SG (2006) Structure, 14(8): 1321-30). Se construyeron proteínas OX40 quiméricas que corresponden a la región
15 extracelular de OX40 de humano (aminoácidos 29-214 de TNFRSF4 de humano, numeración de acuerdo con la secuencia Uniprot P43489), intercambiando uno o más de los cuatro dominios entre las secuencias de humano y de rata. Por ejemplo, la proteína OX40 RHRR quimérica corresponde a la región extracelular de OX40 de rata, en donde el segundo
20 dominio ha sido reemplazado por la secuencia correspondiente del dominio de humano.

Se llevó a cabo una ELISA de unión para poner a prueba la reactividad del anticuerpo VH6/VL9 en la región extracelular de OX40 de

humano (abreviada como HHHH con SEQ ID NO: 11), la región extracelular de OX40 de rata (abreviada como RRRR con SEQ ID NO: 52), y en cuatro proteínas quiméricas de humano-rata: RHRR (SEQ ID NO: 53), HRRR (SEQ ID NO: 54), HHRR (SEQ ID NO: 55) y RRHH (SEQ ID NO: 56). El resultado de esta ELISA se muestra en la figura 7. Como un prerrequisito a este experimento de mapeo de epítopes, se mostró que el anticuerpo VH6/VL9 se une a la proteína OX40 de humano, pero no a la proteína OX40 de rata, indicando que no hubo reactividad cruzada con OX40 de rata. Se encontró que el anticuerpo VH6/VL9 se unió a RHRR y HHRR, pero no a HRRR o RRHH, indicando que el epítipo de VH6/VL9 mapea dentro del segundo dominio de la región extracelular de OX40 de humano.

EJEMPLO 8

El anticuerpo VH6/VL9 bloquea la reacción mixta de linfocitos de humano mediante mecanismos de bloqueo y destrucción

La potencia del anticuerpo VH6/VL9 para suprimir reacciones inmunes *in vitro* se puso a prueba en una reacción mixta de linfocitos (MLR) alogénica unidireccional. La MLR es un modelo *in vitro* de activación y proliferación de células T alorreactivas (O'Flaherty E *et al.*, (2000) Immunology, 100(3): 289-99; DuPont B y Hansen JA (1976) Adv. Immunol. 23: 107-202). Cuando se mezclan células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de dos donadores no emparentados, las células T llegan a ser

activadas a través del reconocimiento de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) alogénicas. Esta activación resulta en la proliferación de linfocitos T. La reacción de MLR se ha usado ampliamente para demostrar el efecto de los fármacos inmunosupresores que eligen como

 5 objetivo a las células T (Bromelow KV *et al.*, (2001) J. Immunol. Methods, 247(1-2): 1-8). Fármacos inmunosupresores tales como la ciclosporina funcionan principalmente a través de la inhibición de la activación de las células T. Además de la prueba del efecto de bloqueo por el anticuerpo VH6/VL9, se investigó también la contribución de mecanismos citotóxicos

 10 tales como la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) sobre la inhibición de la MLR. Tres diferentes formatos de anticuerpo del anticuerpo VH6/VL9 se pusieron a prueba en esta prueba: un formato de IGHG1 (referido en la presente como VH6/VL9), un formato de IGHG1 no fucosilada (IgG1) (referido en la presente como VH6/VL9 no fucosilado), y un formato de IGHG4

 15 (IgG4) (referido en la presente como VH6/VL9 IGHG4 S228P). Se sabe que los anticuerpos de IGHG1 (IgG1) son competentes por mecanismos de citotoxicidad tales como la ADCC. Se sabe que los anticuerpos de IGHG1 no fucosilada exhiben actividad de ADCC aumentada debido a una mayor afinidad por el FcγRIIIa expresado en células citotóxicas tales como las células

 20 asesinas naturales (células NK) (Mizushima T *et al.*, (2011) Genes Cells, 16(11): 1071-80). En contraste, se sabe que los anticuerpos de IGHG4 (IgG4) no tienen dichos mecanismos de citotoxicidad mediada por Fc tales como la ADCC.

Formateo del anticuerpo VH6/VL9

El formateo de la inmunoglobulina IGHG4 que tiene la sustitución S228P se logró reemplazando la secuencia de ADNc que codifica para los dominios constantes CH1 IGHG1, región de gozne IGHG1, CH2 IGHG1 y CH3 IGHG1 con una secuencia de ADNc que codifica para los dominios constantes CH1 IGHG4, región de gozne IGHG4 que tiene la sustitución S228P, CH2 IGHG4 y CH3 IGHG4 en el vector específico de la cadena pesada descrito en el ejemplo 6. Se introdujo la sustitución S228P en un molde de ADNc de cadena pesada de IGHG4 de humano mediante técnicas estándar de mutagénesis por PCR. La cadena pesada resultante tiene a SEQ ID NO: 57. La producción del anticuerpo VH6/VL9 de IGHG1 no fucosilada siguió el protocolo descrito en el ejemplo 14 de la publicación WO2010/095031.

Reacción mixta de linfocitos

Sangre de dos diferentes donadores humanos se colectó en tres S-Monovette de 10 mL con citrato como anticoagulante (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de los dos donadores humanos se purificaron usando tubos Blood-Sep-Filter de 50 mL (distribuidor: Brunschwig, Basel, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron dos veces con medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI, PAA Laboratories, Pasching, Austria) sin FBS. Células estimuladoras de los dos donadores se prepararon mediante incubación con 50 µg/ml de mitomicina C (Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

Buchs, Suiza) por 30 minutos a 37°C. Las células se lavaron entonces tres veces con RPMI sin FBS y se resuspendieron a 1×10^6 células/mL en RPMI, FBS a 10% (PAA Laboratories, Pasching, Austria), L-glutamina 2 mM (Lonza, Leuven, Bélgica), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Biochrom AG, Berlín, Alemania). Las células respondedoras se resuspendieron en RPMI, FBS a 10%, L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina en microplacas de fondo en U de 96 cavidades (TPP, Trasadingen, Suiza). 50,000 células estimuladoras y 80,000 células respondedoras se distribuyeron en un volumen final de 10 µl para cada cavidad. 100 µl de las diluciones del anticuerpo (o medio solo) se añadieron a las cavidades. Las placas se incubaron por 7 días a 37°C en una incubadora de CO₂ a 5%. Las células fueron pulsadas con 0.5 µCi de timidina tritiada (Perkin Elmer, Basel Suiza) durante las últimas 18 horas. Las células se cosecharon en un filtro filtermat (Perkin Elmer), y la radiactividad incorporada se cuantificó en un contador Wallac beta (Perkin Elmer).

Resultados

Los resultados mostrados en la figura 8 demuestran que el anticuerpo VH6/VL9 es capaz de inhibir eficientemente la MLR para dos diferentes individuos (respondedores), con valores de EC₅₀ de alrededor de 100 ng/mL. Los resultados muestran también una diferente respuesta que depende del formato del anticuerpo usado, y se observa una diferencia en la

contribución de los mecanismos de bloqueo y citotóxicos en la MLR de los diferentes individuos.

La reactividad de las células T del respondedor 1 (figura 8A) fue inhibida eficientemente por los formatos de IGHG1 e IGHG4, indicando que los mecanismos citotóxicos no son críticos para el respondedor 1. En contraste, el formato de IGHG4 fue sólo deficientemente capaz de bloquear la MLR del respondedor 2 (figura 8B) a alta concentración, y perdió muy rápidamente su efecto a bajas concentraciones, mientras que el formato de IGHG1 pudo lograr más de 60% de inhibición implicando que, para el respondedor 2, los mecanismos de destrucción dan razón de la mayor parte del efecto inhibidor.

Esta diferencia en el modo de acción surge probablemente del hecho de que la activación, proliferación y supervivencia de las células T en una reacción de MLR dependen variablemente de señales co-estimuladoras de OX40 entre los individuos, dependiendo del grado de reactividad alérgica y posiblemente otras señales co-estimuladoras. Para individuos deficientemente dependientes de las señales co-estimuladoras derivadas de OX40, la eliminación de las células T activadas por el mecanismo de la ADCC es el mecanismo de acción principal de VH6/VL9.

En forma sorprendente, el formato de IGHG1 no fucosilada exhibió una capacidad muy potente para inhibir la MLR para ambos respondedores. Esta observación resalta el hecho de que incluso si un mecanismo de bloqueo puede ser suficiente para lograr la inhibición de la

MLR, la adición o el realce de los mecanismos de destrucción mejora el efecto inhibidor de los anticuerpos anti-OX40. Dicho realce es particularmente útil cuando se tratan trastornos mediados por OX40 sin tener en cuenta el estado co-estimulador de OX40 de los pacientes, por ejemplo, cuando los pacientes

5 tienen bajos niveles de expresión de OX40.

EJEMPLO 9

El anticuerpo VH6/VL9 bloquea la enfermedad de injerto xenogénico contra hospedero

10

La reacción de injerto xenogénico contra hospedero (GVH) es un modelo para la enfermedad de injerto alogénico contra hospedero (GVHD) observada después del trasplante de médula ósea en pacientes humanos. La reacción de GVH es una respuesta inmune aguda mediada por las células

15 inmunes injertadas que atacan al ambiente del hospedero como una consecuencia del reconocimiento alogénico o xenogénico del MHC (Murphy WJ *et al.*, (1996) Semin. Immunol. 8(4): 233-41). Los linfocitos T son las células efectoras principales de las reacciones de GVH. La potencia inmunosupresora del anticuerpo VH6/VL9 se puso a prueba en un modelo de

20 enfermedad de injerto xenogénico contra hospedero basado en la reconstitución de ratones SCID con PBMCs de humano. En este modelo, las PBMCs de humano y principalmente los linfocitos T lanzan una fuerte respuesta contra las células hospederas de ratón. La reacción lleva

notablemente a inflamación severa intestinal y de la piel acompañada por pérdida de peso. La lectura de salida más relevante de este modelo, es la supervivencia de los animales.

5 Método

Se irradió sub-letalmente a animales (ratones SCID) antes de ser reconstituidos con 30 millones de PBMCs de humano intraperitonealmente. Los ratones fueron agotados también de células NK de ratón mediante inyecciones dobles semanalmente con el anticuerpo TMbeta1. El tratamiento con el anticuerpo VH6/VL9, Enbrel® o vehículo se dio i.v. semanalmente como cinco dosis consecutivas, y comenzaron dos días antes de la inyección de las PBMCs. Los animales se trataron con vehículo (PBS) o con el anticuerpo VH6/VL9 a 10 mg/kg o 1 mg/kg, o Enbrel® (una proteína de fusión del receptor 2 del FNT soluble de humano fusionada con el componente Fc de IgG1 de humano, Amgen-Pfizer) a 8 mg/kg. Los animales fueron verificados y calificados tres veces por semana para síntomas de GVHD, incluyendo pérdida de peso, diarrea, aspecto del pelaje y comportamiento general. Los animales eran éticamente sacrificados, si se consideraba que los síntomas eran demasiado severos.

20

Resultados

La figura 9 muestra que el anticuerpo VH6/VL9 suprimió muy potentemente la reacción de la GVHD, incluso a la dosis menor de 1 mg/kg.

165

En forma sorprendente, el anticuerpo VH6/VL9 demostró eficacia mejorada sobre Enbrel[®], que es una terapia reconocida para la GVHD en humanos (Xhaard A *et al.*, (2011) Bull. Cancer, 98(8): 889-99; Simpson D (2001) Expert Opin. Pharmacother. 2(7): 1109-17). El tiempo de supervivencia medio de los animales tratados con el anticuerpo VH6/VL9 a 1 o 10 mg/kg, fue cuatro veces más largo en comparación con el grupo tratado con vehículo (cuadro 10), y dos veces más largo en comparación con Enbrel[®]. Además, este resultado resalta que el anticuerpo VH6/VL9 no posee actividad agonista, ya que se ha reportado que un anticuerpo anti-OX40 agonista empeora la GVHD en modelos de GVHD en el ratón alogénico (Valzasina B *et al.*, (2005) Blood, 105(7): 2845-51; Blazar BR *et al.*, (2003) Blood, 101(9): 3741-8), un evento que no se observó en el presente estudio.

CUADRO 10

Tiempo de supervivencia medio (en días) de los grupos de tratamiento indicados

Tratamiento	Vehículo	Enbrel [®]	1D4 (1 mg/kg)	1D4 (10 mg/kg)
Valor medio de supervivencia (días)	11.5	20.5	42	47.5

Vehículo: sólo PBS. 1D4: anticuerpo GBR 830-1D4; Enbrel fue el producto clínico.

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y/o que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.
- 10
- 15 2.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y una CDR3 de
- 20 cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y/o comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una CDR2 de cadena ligera que comprende la

167

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

3.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado además porque el anticuerpo o
5 fragmento del mismo es un anticuerpo de murino, anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

4.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo humanizado.

10 5.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

15 6.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región no de CDR de una secuencia de región variable de cadena pesada que es por lo menos 80% idéntica a la región no de CDR de la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7.

20 7.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de cadena pesada que

comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 35, 36, 37 y 38.

8.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado además porque la secuencia de cadena pesada comprende una región no de CDR que es por lo menos 80% idéntica a la región no de CDR de la secuencia de región variable de cadena pesada de la secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 35, 36, 37 o 38.

9.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 58, 59, 79 y 80.

10.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región no de CDR de una secuencia de región variable de cadena pesada que es por lo menos 80% idéntica a la región no de CDR de la secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 58, 59, 79 y 80.

11.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región de estructura variable de cadena pesada que es el producto de o derivado de un gen de humano seleccionado

del grupo que consiste de IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19), IGHV2-70*01 (SEQ ID NO: 20), IGHV2-70*13 (SEQ ID NO: 21), IGHV2-5*09 (SEQ ID NO: 22) e IGHV2-70*11 (SEQ ID NO: 23).

12.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región de estructura variable de cadena pesada que es el producto de o derivado del gen de humano IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19), y en donde la región de estructura variable de cadena pesada comprende por lo menos una modificación de aminoácido de la región de estructura variable de cadena pesada correspondiente del anticuerpo de murino correspondiente.

13.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, y en donde la región de estructura variable de cadena pesada comprende por lo menos una modificación de aminoácido de la región de estructura variable de cadena pesada correspondiente del anticuerpo de murino correspondiente.

14.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 12 o 13, caracterizado además porque la modificación de aminoácido comprende una sustitución de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de 23, 35b, 48,

50, 60 y 62, en donde la posición de aminoácido de cada miembro de grupo se indica de acuerdo con la numeración de Kabat.

15.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 12 o 13, caracterizado además porque la modificación de aminoácido comprende una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de 23S, 35bG, 48L, 50H, 60N y 62A, en donde la posición de aminoácido de cada miembro de grupo se indica de acuerdo con la numeración de Kabat.

16.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

17.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región no de CDR de una secuencia de región variable de cadena ligera que es por lo menos 80% idéntica a la región no de CDR de la secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 8.

18.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 45, 46, 47 y 49.

19.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado además porque la secuencia de cadena ligera comprende una región no de CDR que es por lo menos 80% idéntica a la región no de CDR de la secuencia de la región variable de cadena ligera de la secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 45, 46, 47 o 49.

20.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 60, 86, 87 y 89.

21.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región no de CDR de una secuencia de región variable de cadena ligera que es por lo menos 80% idéntica a la región no de CDR de la secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 60, 86, 87 y 89.

22.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región de estructura variable de cadena ligera que es el producto de o derivado de un gen de humano seleccionado del grupo que consiste de IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24), IGKV1-39*01 (SEQ

ID NO: 25), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) e IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28).

23.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado además porque el anticuerpo o
5 fragmento del mismo comprende una región de estructura variable de cadena ligera que es el producto de o derivado del gen de humano IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24), y en donde la región de estructura variable de cadena ligera comprende por lo menos una modificación de aminoácido de la región de estructura correspondiente de la región variable de cadena ligera del
10 anticuerpo de murino correspondiente.

24.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39, y en donde la
15 región de estructura variable de cadena ligera comprende por lo menos una modificación de aminoácido de la región de estructura variable de cadena ligera correspondiente del anticuerpo de murino correspondiente.

25.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 23 o 24, caracterizado además porque la
20 modificación de aminoácido comprende una sustitución de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de 1, 33, 34, 46, 47, 54, 56 y 71, en donde la posición de aminoácido de cada miembro de grupo se indica de acuerdo con la numeración de Kabat.

26.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 23 o 24, caracterizado además porque la modificación de aminoácido comprende una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de 1Q, 33M, 34H, 46P, 47W, 54L, 56S y 71Y, en donde la posición de aminoácido de cada miembro de grupo se indica de acuerdo con la numeración de Kabat.

27.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con las reivindicaciones 23 o 24, caracterizado además porque la modificación de aminoácido comprende una delección de aminoácido en la posición de aminoácido 31, en donde la posición de aminoácido se indica de acuerdo con la numeración de Kabat.

28.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo comprende: (a) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38; y (b) una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47.

29.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo comprende: (a) una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 59; y (b) una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.

30.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, caracterizado además porque por lo menos una de las CDRs de cadena pesada y/o por lo menos una de las CDRs de cadena ligera comprende por lo menos una modificación de aminoácido.

5 31.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, caracterizado además porque comprende adicionalmente regiones constantes de cadena pesada y/o ligera.

10 32.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado además porque la región constante de cadena pesada de humano se selecciona del grupo de inmunoglobulinas de humano que consisten de IGHG1, IGHG1 no fucosilada e IGHG4.

33.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, caracterizado además porque el anticuerpo es un anticuerpo monovalente.

15 34.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, caracterizado además porque el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.

20 35.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, caracterizado además porque el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')₂, scFv, dímeros de Fv de cadena sencilla biespecíficos, cuerpos bivalentes, cuerpos trivalentes y scFv fusionado genéticamente con el mismo anticuerpo o un anticuerpo diferente.

36.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, caracterizado además porque el anticuerpo comprende una región Fc variante que comprende por lo menos una modificación de aminoácido respecto a la región Fc del anticuerpo precursor, mientras que el anticuerpo que comprende la región Fc variante exhibe función efectora alterada en comparación con el anticuerpo precursor.

37.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo se une a OX40 de humano con una afinidad (K_D) de 110 nM o menos.

38.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo retiene por lo menos 75% de la afinidad de unión (K_D) a OX40 del anticuerpo quimérico correspondiente.

39.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, caracterizado además porque el anticuerpo o fragmento del mismo tiene afinidad de unión (K_D) a OX40 equivalente o mayor cuando se compara con el anticuerpo quimérico correspondiente.

40.- El anticuerpo o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, caracterizado además porque el anticuerpo tiene un fragmento FAB cuya temperatura de termoestabilidad es mayor de 75°C.

41.- Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano y el cual se une al mismo epítotope que el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36.

5 42.- Un epítotope en el dominio extracelular de OX40 de humano que es unido por el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36.

43.- El epítotope de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado además porque el dominio extracelular de OX40 de humano es el dominio 2 (SEQ ID NO: 76).

10 44.- Un ácido nucleico aislado que codifica para el anticuerpo o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41.

45.- El ácido nucleico aislado de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado además porque comprende ADN que codifica para la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 61 o 62; y/o ADN que codifica para la región
15 variable de cadena ligera que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 63.

46.- Un vector que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 44 o 45.

20 47.- Una célula hospedera que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 44 o 45 o el vector de la reivindicación 46.

48.- Un método para producir un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano, que comprende cultivar la célula

hospedera de la reivindicación 47 de modo que el ácido nucleico sea expresado y el anticuerpo producido.

49.- Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano codificado por el ácido nucleico aislado de la reivindicación 44 o 45.

5 50.- Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

51.- Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41 enlazado a
10 un agente terapéutico.

52.- Una composición que comprende el inmunoconjugado de la reivindicación 51 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

53.- La composición de conformidad con la reivindicación 50 o 52, caracterizada además porque comprende adicionalmente otro agente
15 farmacéuticamente activo.

54.- Un método para tratar un trastorno mediado por OX40 en un sujeto, el método comprendiendo administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41.

20 55.- El método de conformidad con la reivindicación 54, caracterizado además porque el trastorno mediado por OX40 se selecciona del grupo que consiste de infecciones (virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias), choque endotóxico asociado con infección, artritis, artritis

178

reumatoide, asma, EPOC, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad pilonidal, peritonitis, psoriasis, vasculitis, adherencias quirúrgicas, accidente cerebrovascular, diabetes tipo I, enfermedad de Lyme, artritis, meningoencefalitis, uveítis autoinmune, trastornos inflamatorios del sistema nervioso central y periférico mediados por el sistema inmune, tales como esclerosis múltiple, lupus (tal como lupus eritematoso sistémico) y síndrome de Guillain-Barré, dermatitis atópica, hepatitis autoinmune, alveolitis fibrosante, enfermedad de Grave, nefropatía por IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Meniere, pénfigo, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, otros trastornos autoinmunes, pancreatitis, trauma (quirúrgico), enfermedad de injerto contra hospedero (GVHD), rechazo de trasplante, enfermedad cardiovascular que incluye enfermedades isquémicas tales como infarto al miocardio así como aterosclerosis, coagulación intravascular, resorción ósea, osteoporosis, osteoartritis, periodontitis, hipoclorhidria y neuromielitis óptica.

56.- El método de conformidad con la reivindicación 54, caracterizado además porque el trastorno mediado por OX40 se selecciona del grupo que consiste de infecciones (virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias), choque endotóxico asociado con infección, artritis, artritis reumatoide, asma, bronquitis, influenza, virus sincicial respiratorio, neumonía,

- EPOC, fibrosis pulmonar idiopática (IPF), alveolitis fibrosante criptogénica (CFA), neumonía intersticial fibrosante idiopática, enfisema, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Peyronie,
- 5 enfermedad celíaca, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad pilonidal, peritonitis, psoriasis, vasculitis, adherencias quirúrgicas, accidente cerebrovascular, diabetes tipo I, enfermedad de Lyme, artritis, meningoencefalitis, uveítis autoinmune, trastornos inflamatorios del sistema nervioso central y periférico mediados por el sistema inmune, tales como
- 10 esclerosis múltiple, lupus (tal como lupus eritematoso sistémico) y síndrome de Guillain-Barré, dermatitis atópica, hepatitis autoinmune, alveolitis fibrosante, enfermedad de Grave, nefropatía por IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Meniere, pénfigo, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, otros
- 15 trastornos autoinmunes, pancreatitis, trauma (quirúrgico), enfermedad de injerto contra hospedero (GVHD), rechazo de trasplante, enfermedad cardiovascular que incluye enfermedades isquémicas tales como infarto al miocardio así como aterosclerosis, coagulación intravascular, resorción ósea, osteoporosis, osteoartritis, periodontitis, hipoclorhidria y neuromielitis óptica.
- 20 57.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 54 a 56, caracterizado además porque el sujeto tiene un bajo nivel de expresión de OX40.

180 29

163

58.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 54 a 56, caracterizado además porque el anticuerpo tiene citotoxicidad aumentada en comparación con el anticuerpo que tiene la región constante de cadena pesada de humano IGHG1.

5 59.- El uso de un anticuerpo o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41 como un medicamento.

60.- El uso de un anticuerpo o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno mediado por OX40.

10 61.- El uso de un anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 60, en donde el trastorno mediado por OX40 es GVHD, y en donde el anticuerpo o fragmento del mismo es más efectivo que Enbrel® en la supresión de la GVHD.

15 62.- El anticuerpo o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, para usarse como un medicamento.

63.- El anticuerpo o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, para usarse en un método para tratar un trastorno mediado por OX40.

20 64.- El anticuerpo o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, para usarse en un método para tratar un trastorno mediado por OX40, en donde el trastorno mediado por OX40 es GVHD, y en donde el anticuerpo o fragmento del mismo es más efectivo que Enbrel® en la supresión de la GVHD.

181
180

164

65.- Un artículo de fabricación que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, la composición de la reivindicación 50, 52 o 53 o el inmunoconjugado de la reivindicación 51, para el tratamiento de un trastorno mediado por OX40.

- 5 66.- Un kit que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, la composición de la reivindicación 50, 52 o 53 o el inmunoconjugado de la reivindicación 51, para el tratamiento de un trastorno mediado por OX40.

- 10 67.- Un método de selección *in vitro* para detectar a un paciente que tiene un bajo nivel de expresión de OX40, que comprende los pasos de: (a) purificar células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de una muestra de sangre de un paciente; (b) someter las PBMCs a análisis citométrico de flujo; y (c) determinar el número de células positivas para OX40 en células T CD4⁺ y/o CD8⁺, y comparar este número con niveles control.

15

182
#41

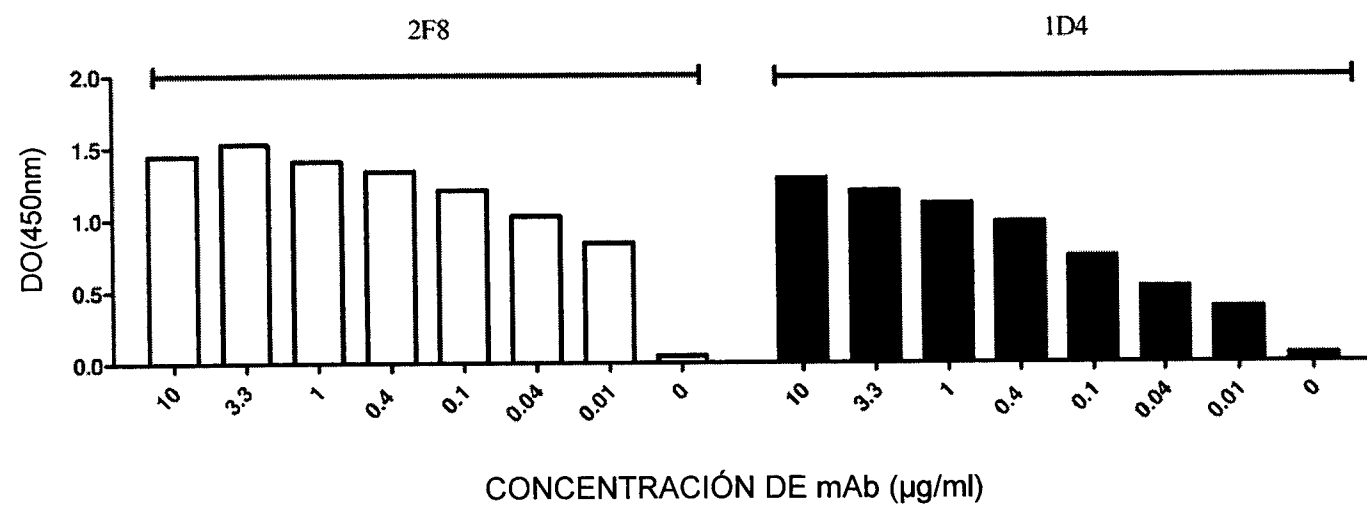
RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen a OX40 de humano; más
5 específicamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une a OX40 de humano que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y/o una CDR3 de cadena pesada que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y/o que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

15

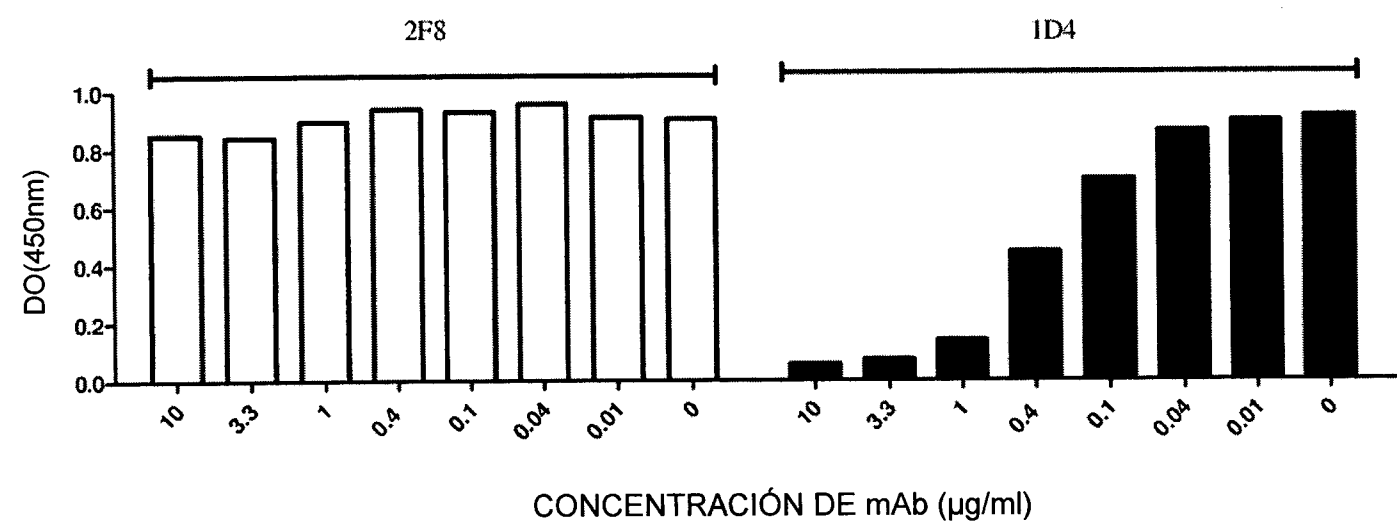
20

FIG. 1A



183/27

FIG. 1B



[Handwritten signature]

FIG. 2

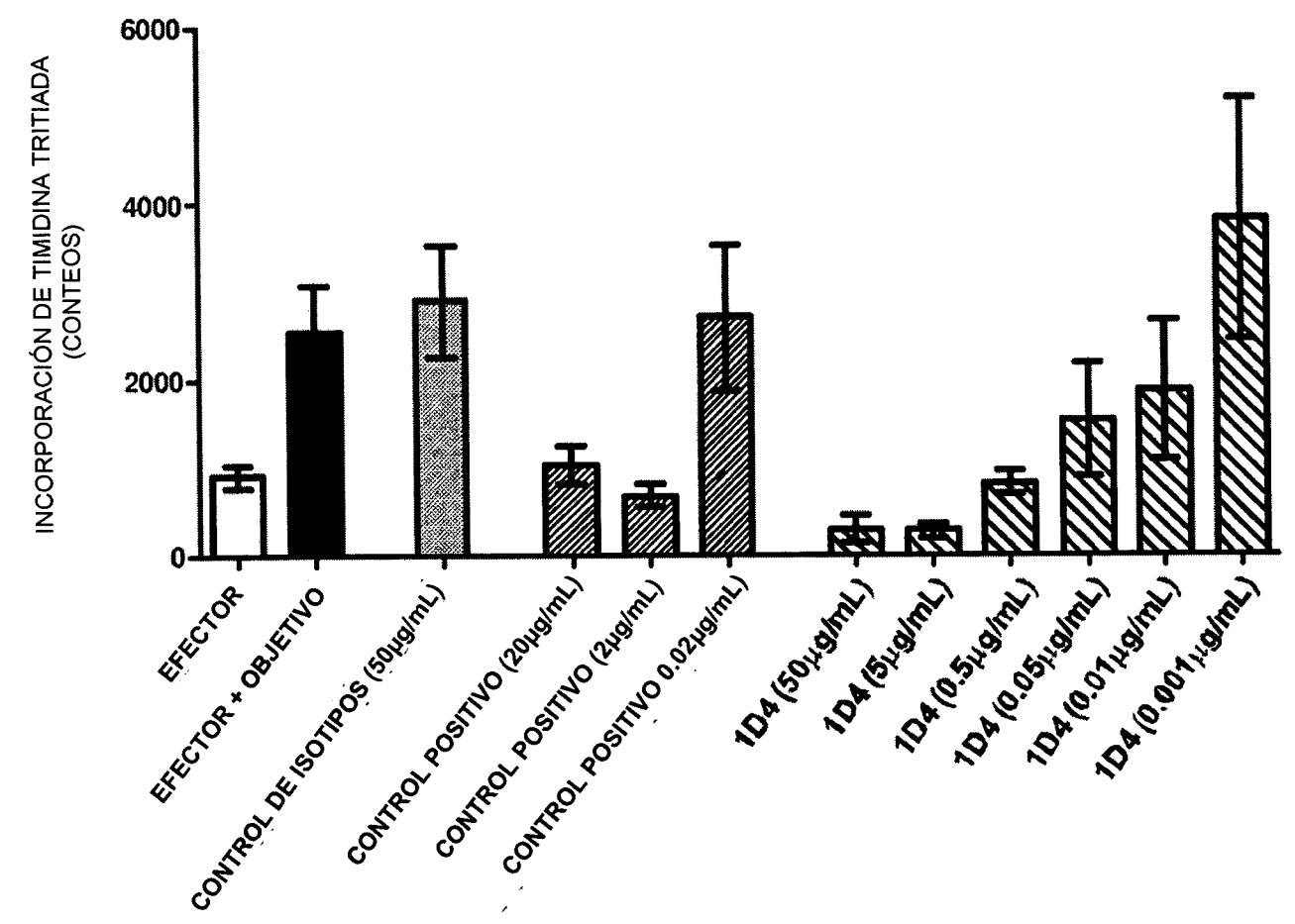
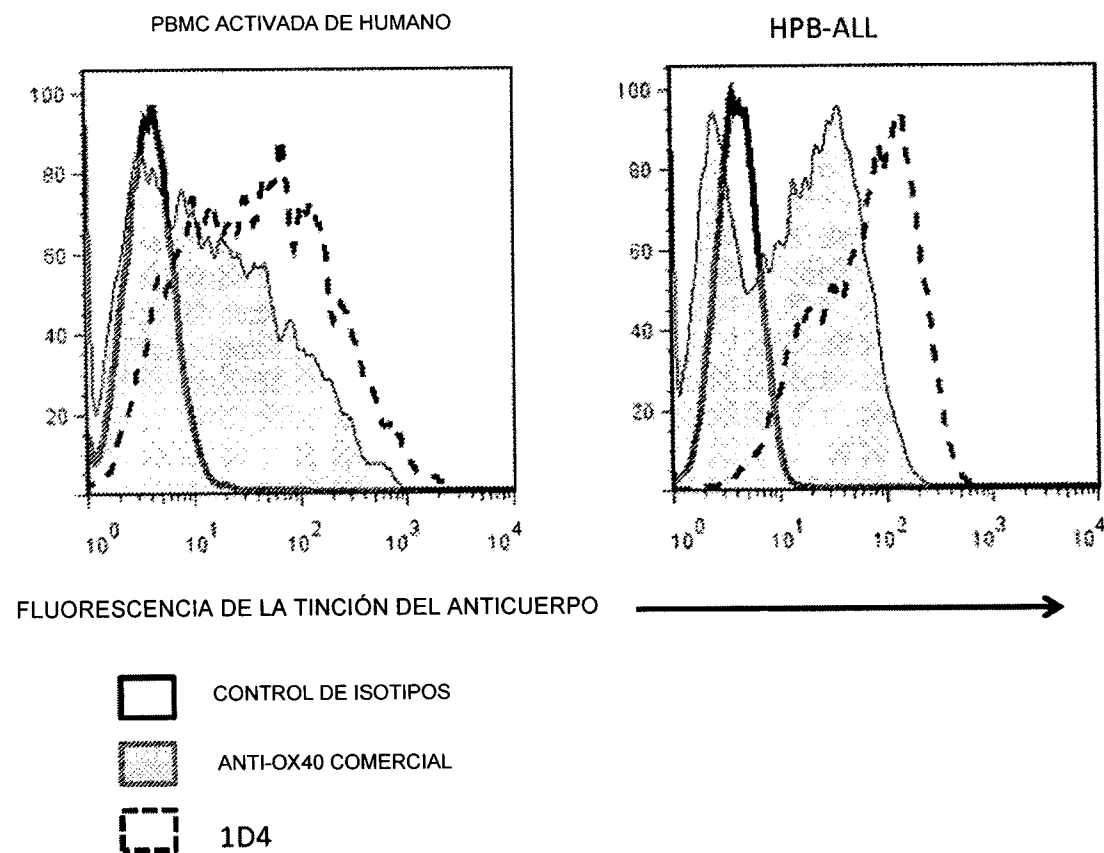


FIG. 3A



[Handwritten signature]

187

186

FIG. 3B

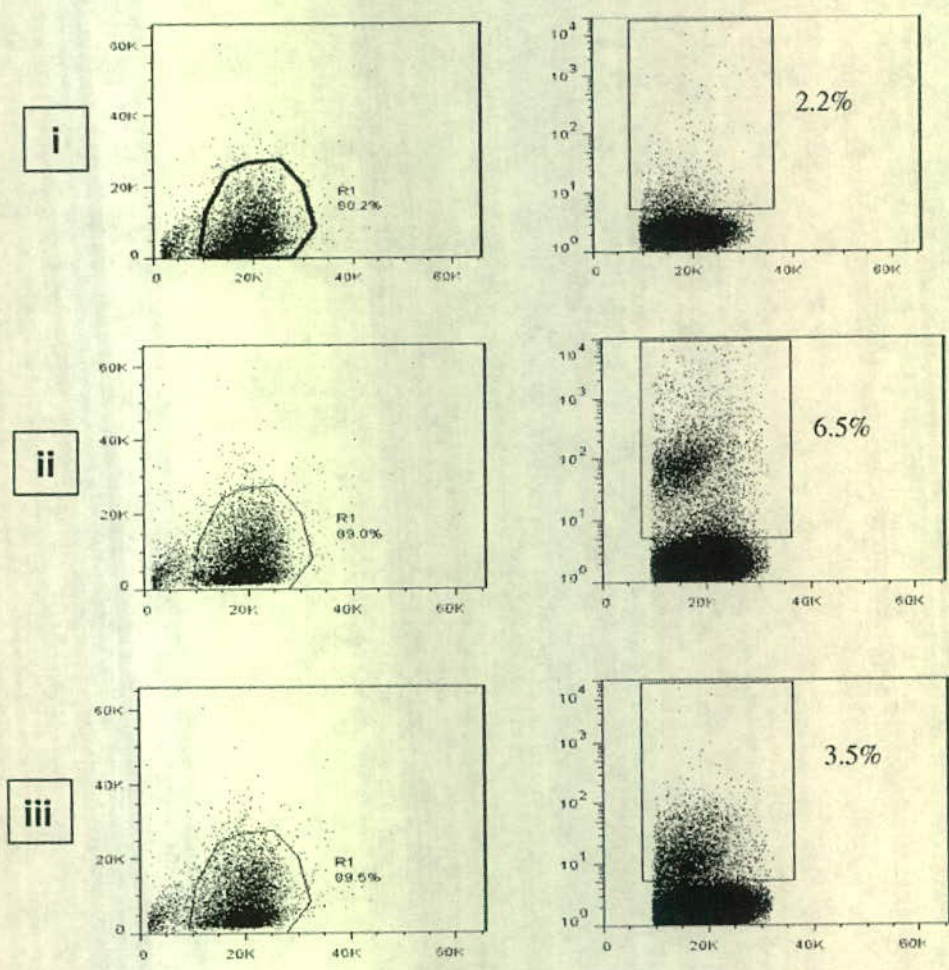
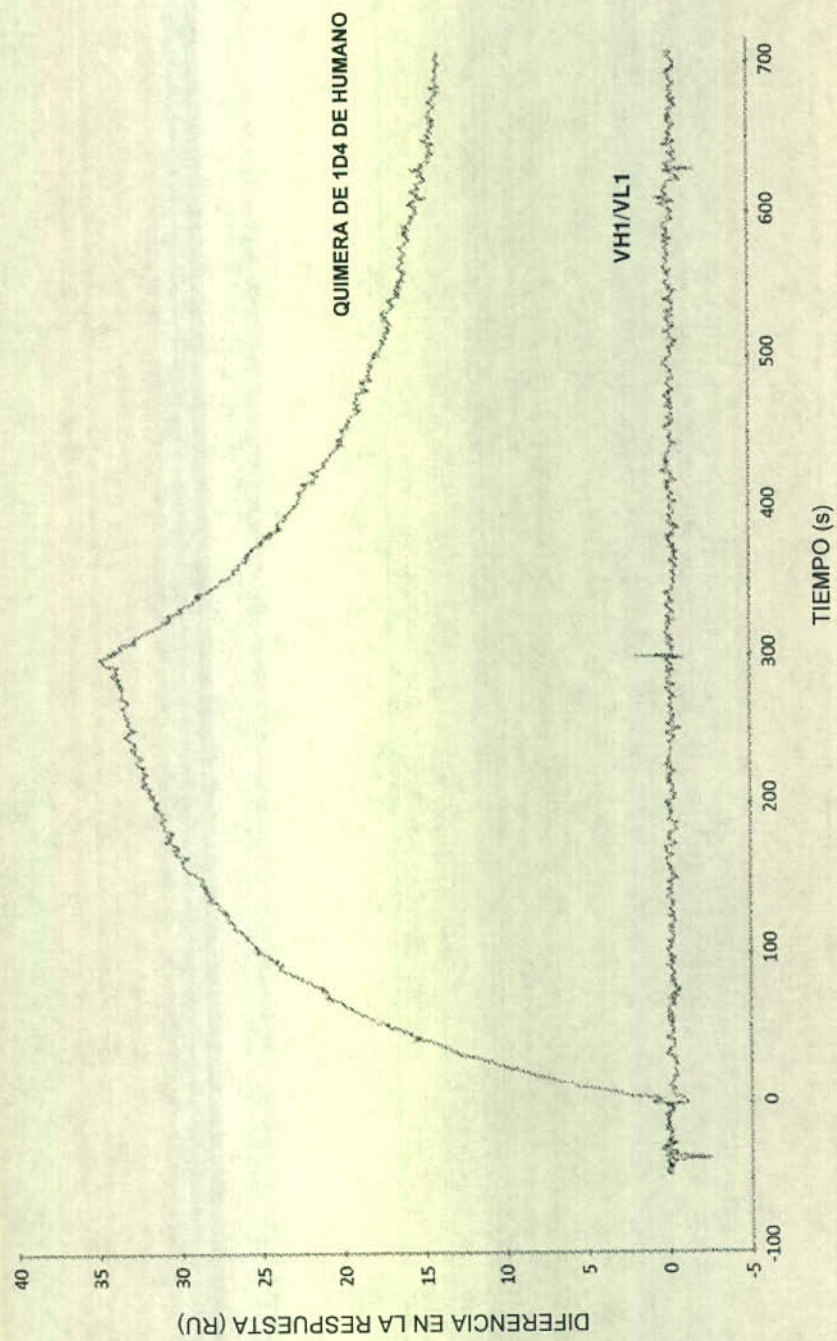


FIG. 4A



188

188

FIG. 4B

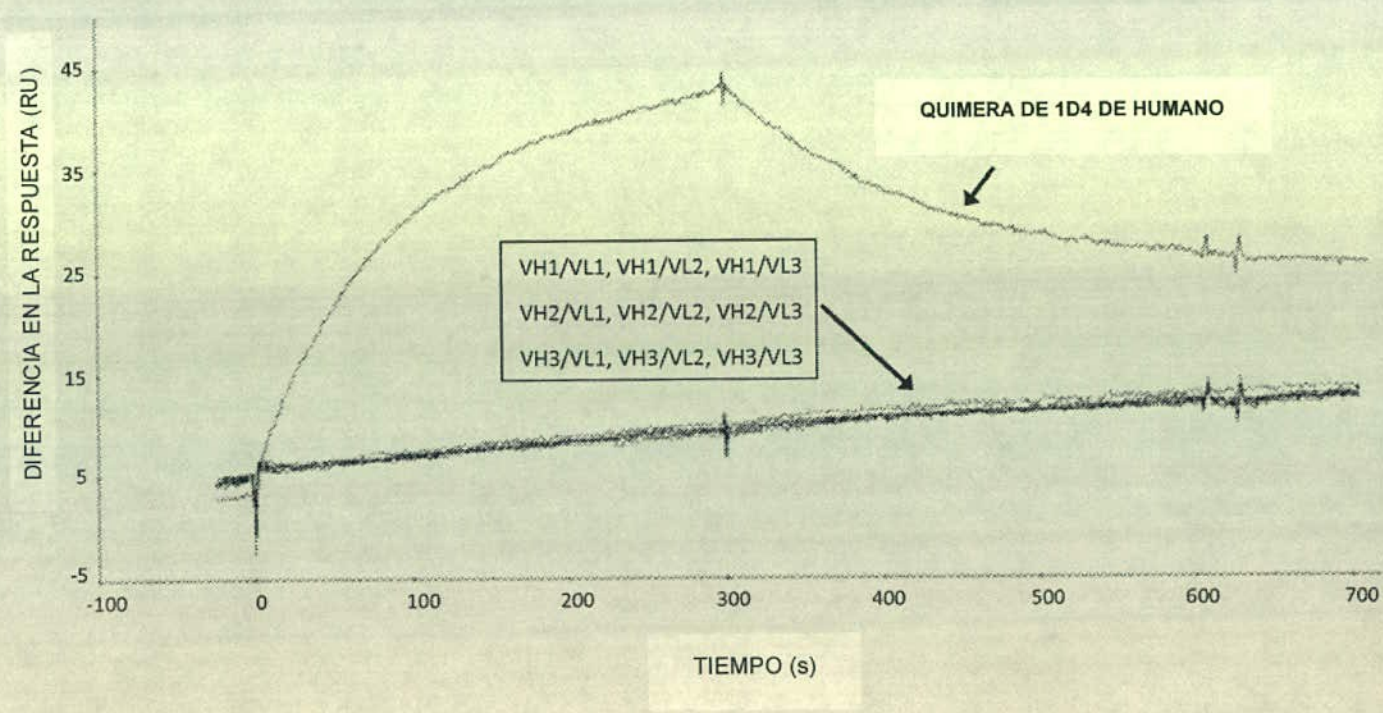


FIG. 4C

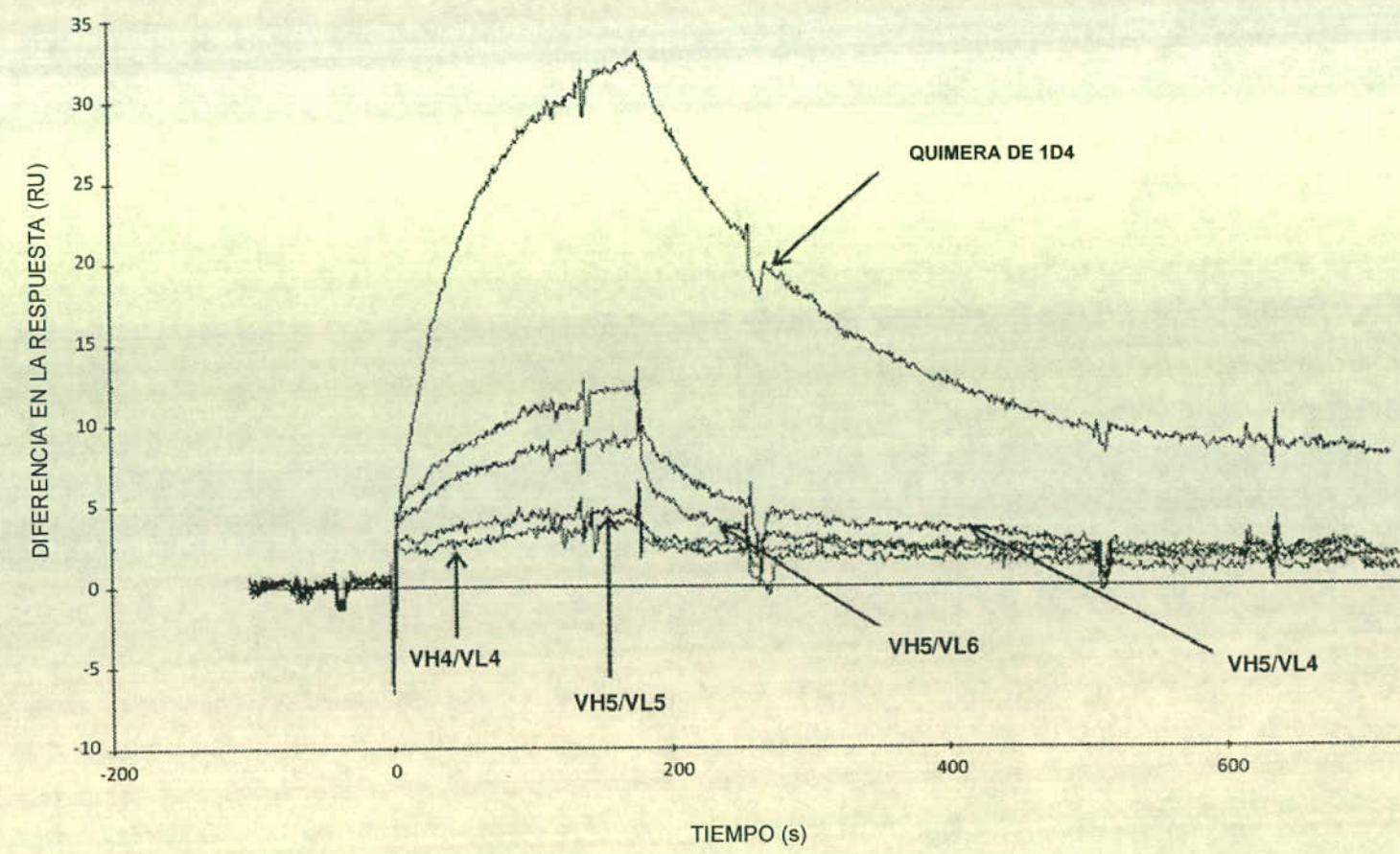


FIG. 4D

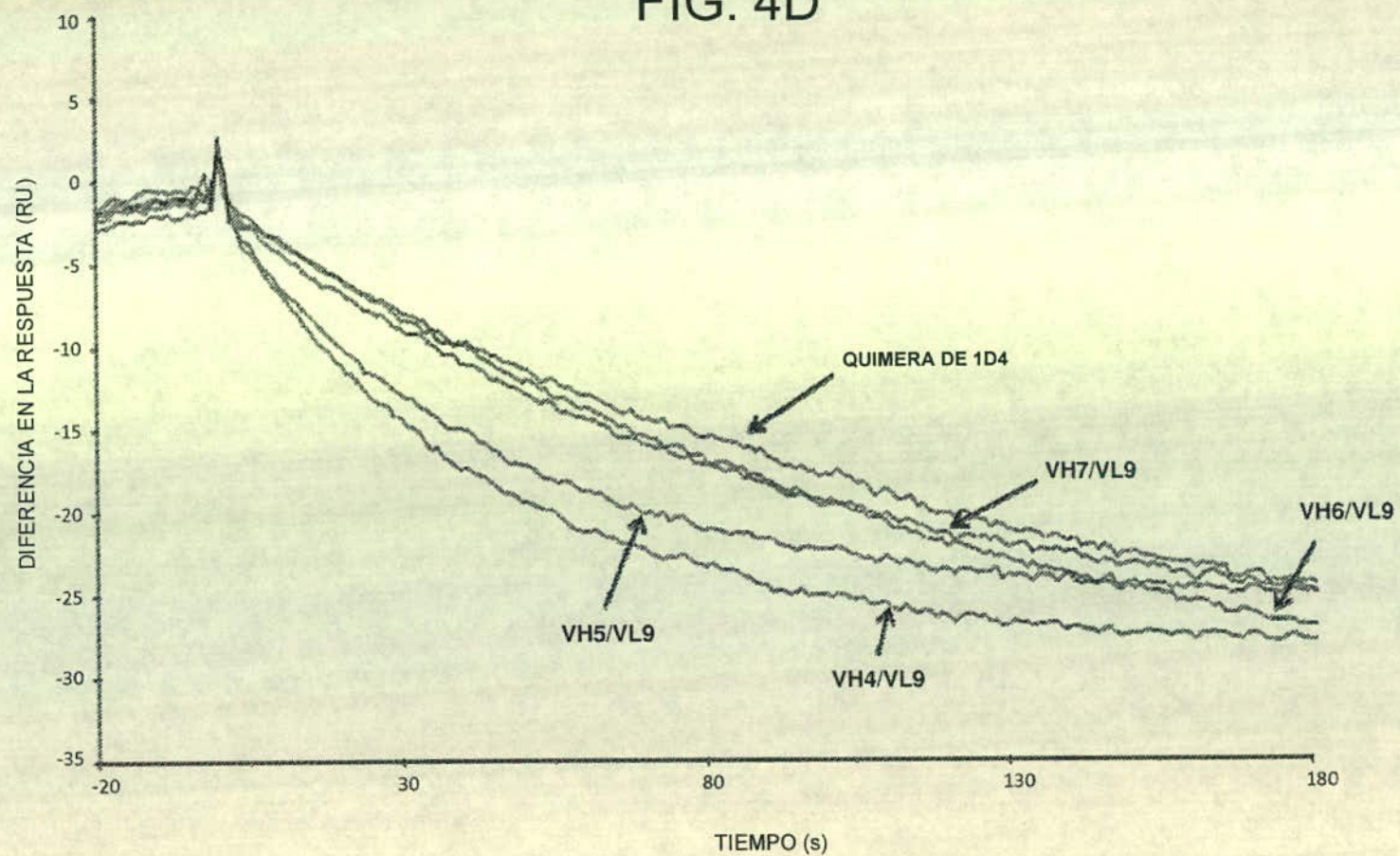


FIG. 4E

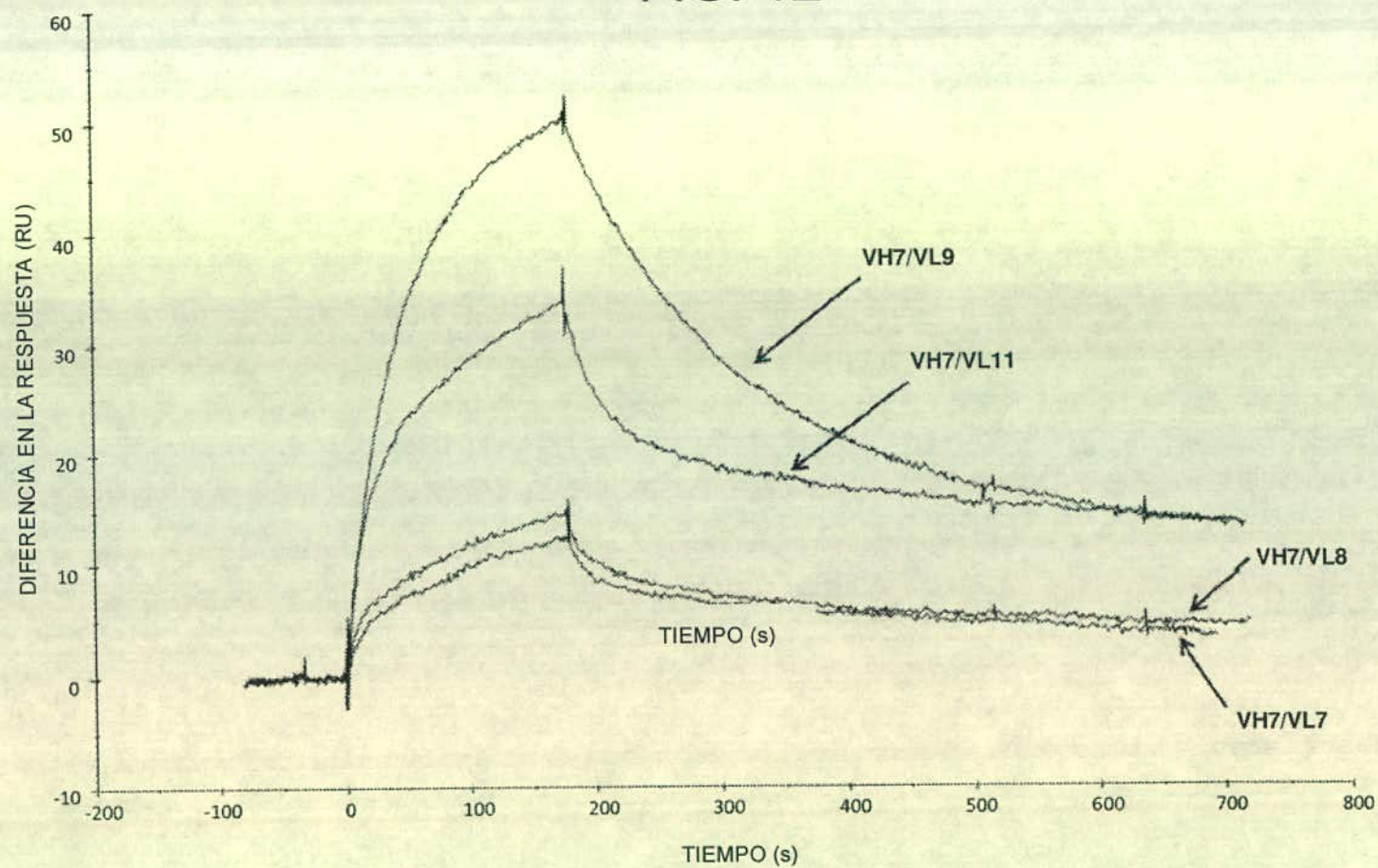


FIG. 4F

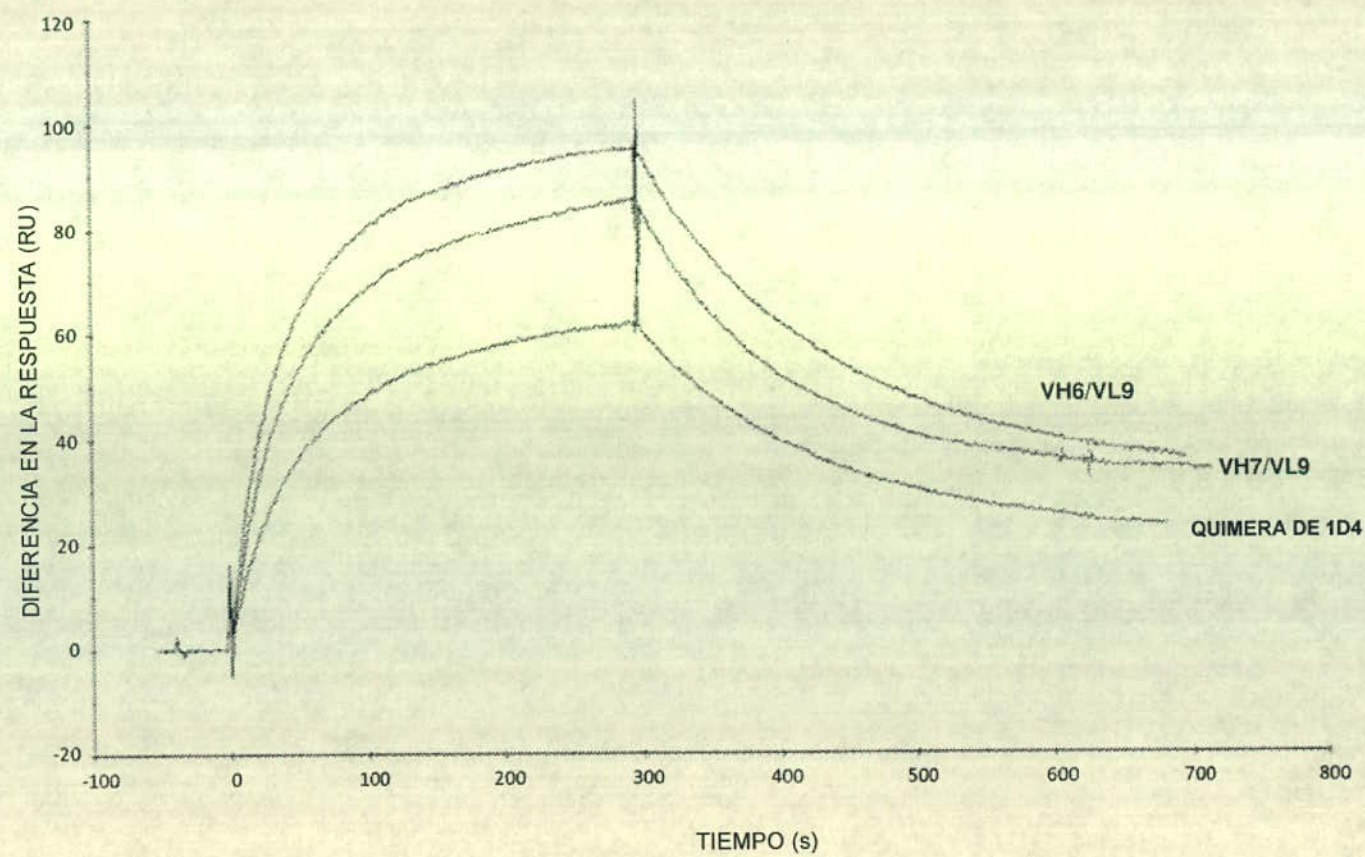


FIG. 5B

Kabat VL#
1D4 VL
HUMANO IGKV 3-11*01
VL1
VL2 [L33M]
VL3 [F71Y]
VL4 [L33M/F71Y]
VL5 [L33M/L46P/L47W/F71Y]
VL6 [E1Q/L33M/L46P/L47W/F71Y]
VL7 [Y31del/L33M/F71Y]
VL8 [Y31del/L33M/A34H/F71Y]
VL9 [Y31del/L33M/A34H/L46P/L47W/F71Y]
VL10 [Y31del/L33M/R54L/T56S/F71W]
VL11 [Y31del/L33M/A34H/R54L/T56S/F71Y]

```

10      20      30      40      50      60      70
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234
QIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASS-----SVSYMHWYQKPGSGPPKIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLT
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQ-----SVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRTATGIPARFSGSGSGDTFTLT
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASS-----SVSYLAWYQKPGQAPRLLIYATSNRATGIPARFSGSGSGDTFTLT
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASS-----SVSYMWYQKPGQAPRLLIYATSNRATGIPARFSGSGSGDTFTLT
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASS-----SVSYLAWYQKPGQAPRLLIYATSNRATGIPARFSGSGSGDTFTLT
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASS-----SVSYLAWYQKPGQAPRLLIYATSNRATGIPARFSGSGSGDTFTLT
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASS-----SVSYMWYQKPGQAPRLLIYATSNRATGIPARFSGSGSGDTFTLT
QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASS-----SVSYMWYQKPGQAPRPIYATSNRATGIPARFSGSGSGDTFTLT
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASS-----SVSYMWYQKPGQAPRLLIYATSNRATGIPARFSGSGSGDTFTLT
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASS-----SVSYMWYQKPGQAPRLLIYATSNRATGIPARFSGSGSGDTFTLT
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASS-----SVSYMHWYQKPGQAPRLLIYATSNRATGIPARFSGSGSGDTFTLT
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASS-----SVSYMHWYQKPGQAPRPIYATSNRATGIPARFSGSGSGDTFTLT
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASS-----SVSYMHWYQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPARFSGSGSGDTFTLT
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASS-----SVSYMHWYQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPARFSGSGSGDTFTLT

```

Kabat VL#
1D4 VL
HUMANO IGV 3-11*01
VL1
VL2 [L33M]
VL3 [F71Y]
VL4 [L33M/F71Y]
VL5 [L33M/L46P/L47W/F71Y]
VL6 [E1Q/L33M/L46P/L47W/F71Y]
VL7 [Y31del/L33M/F71Y]
VL8 [Y31del/L33M/A34H/F71Y]
VL9 [Y31del/L33M/A34H/L46P/L47W/F71Y]
VL10 [Y31del/L33M/R54L/T56S/F71Y]
VL11 [Y31del/L33M/A34H/R54L/T56S/F71Y]

[illegible]

196

FIG. 6

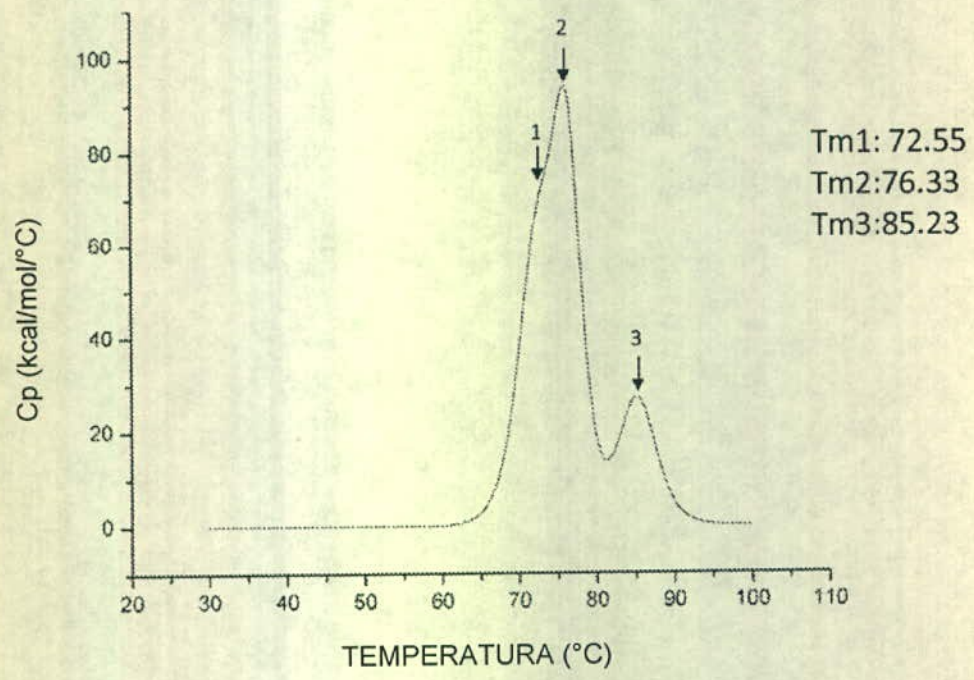
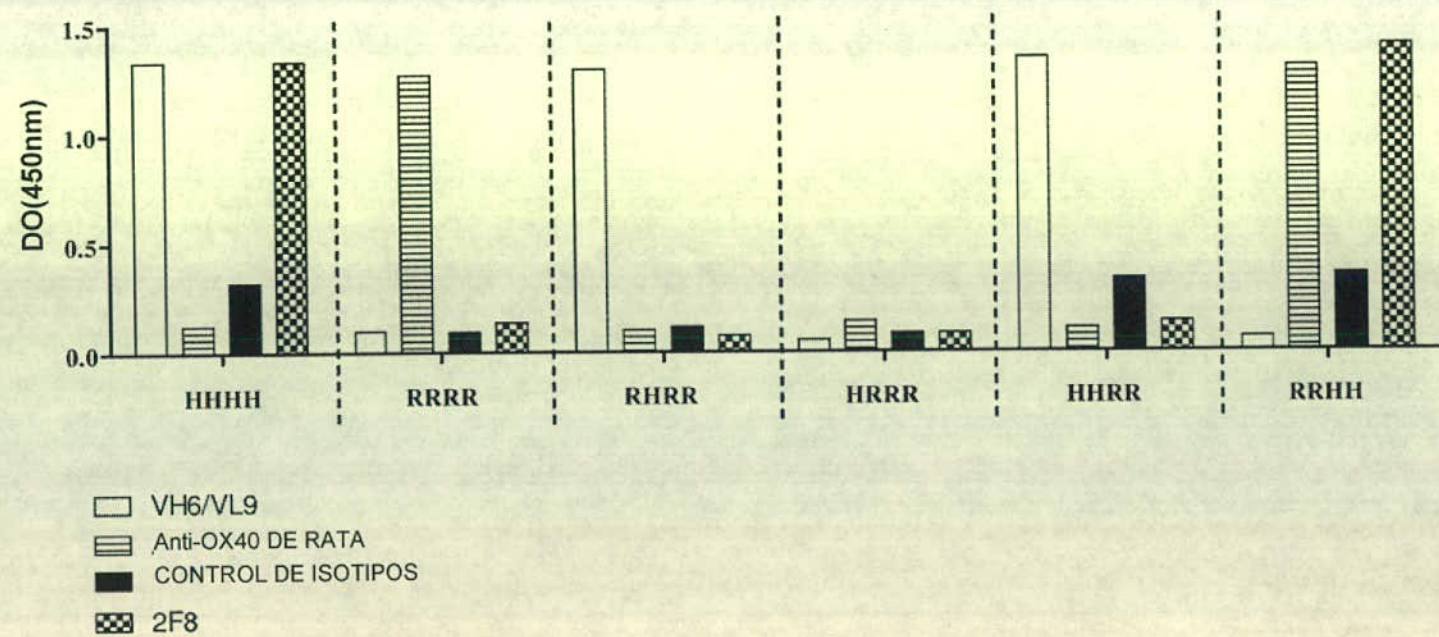


FIG. 7



198
199

FIG. 8A

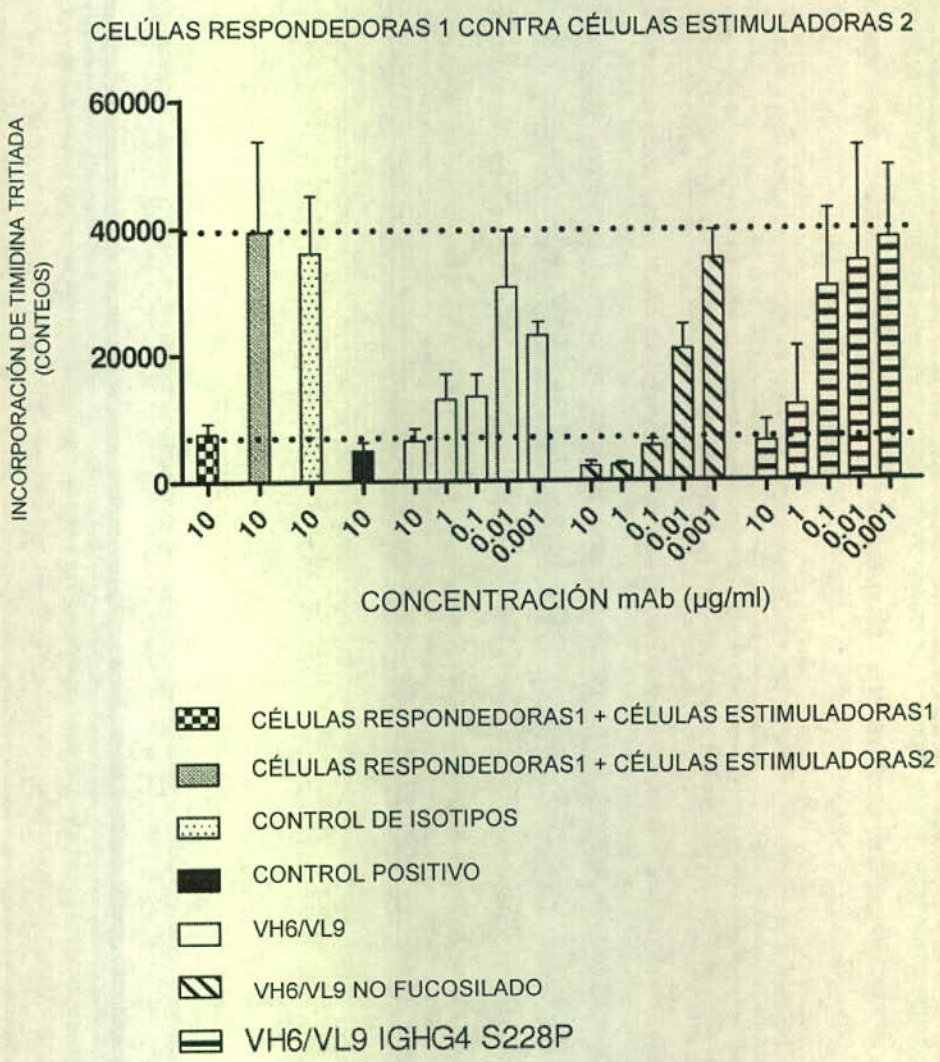
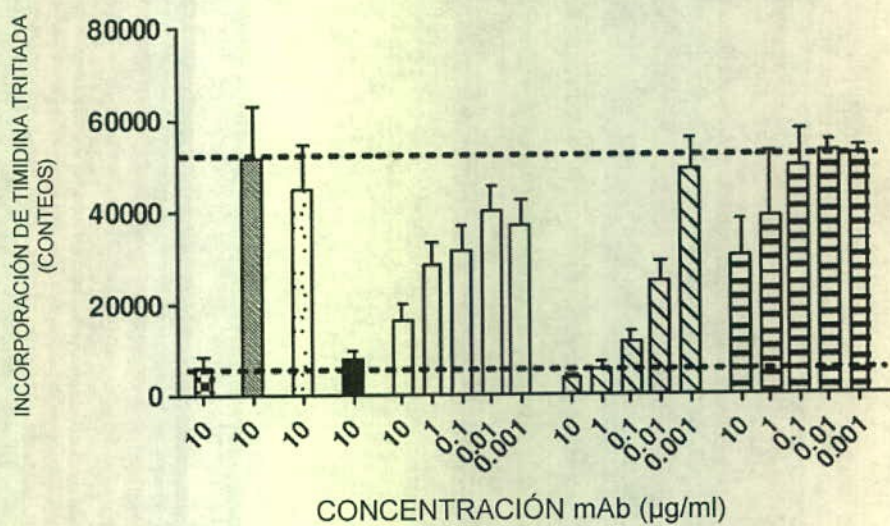


FIG. 8B

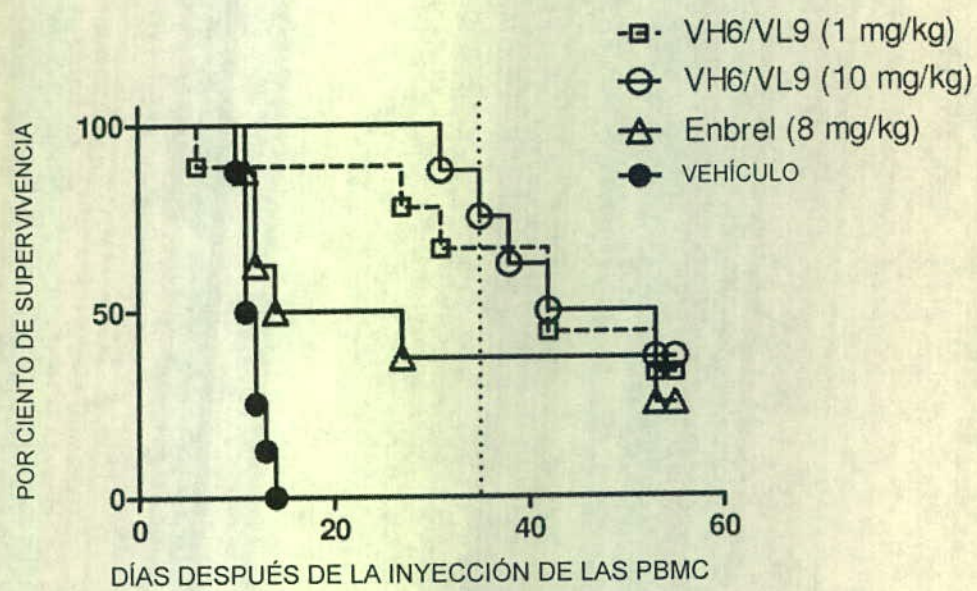
CELÚLAS RESPONDEDORAS 2 CONTRA CÉLULAS ESTIMULADORAS 1



- | | |
|---|---|
|  | CÉLULAS RESPONDEDORAS2 + CÉLULAS ESTIMULADORAS2 |
|  | CÉLULAS RESPONDEDORAS2 + CÉLULAS ESTIMULADORAS1 |
|  | CONTROL DE ISOTIPOS |
|  | CONTROL POSITIVO |
|  | VH6/VL9 |
|  | VH6/VL9 NO FUCOSILADO |
|  | VH6/VL9 IGHG4 S228P |

199
200

FIG. 9



201

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Solicitante: Glenmark Pharmaceuticals S.A.

<120> Título de la invención: Anticuerpos que se unen a OX40 y sus usos

<130> Número de referencia: 17741/US

<150> Número de solicitud previa: US 61/506,491

<151> Fecha de presentación de la solicitud previa: 2011-07-11

<160> Números de secuencias: 89

<170> Software: PatentIn versión 3.5

<210> SEQ ID NO: 1

<211> Longitud: 10

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:

<223> Otra Información: cadena pesada CDR 1 de 1D4

<400> Secuencia: 1

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 2

<211> Longitud: 7

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:

<223> Otra Información: cadena pesada CDR 2 de 1D4

<400> Secuencia: 2

Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> SEQ ID NO: 3

<211> Longitud: 10

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:

<223> Otra Información: cadena pesada CDR 3 de 1D4

<400> Secuencia: 3

Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr

201
202

1 5 10

<210> SEQ ID NO: 4
<211> Longitud: 5
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:
<223> Otra Información: cadena ligera CDR 1 de 1D4

<400> Secuencia: 4

Ser Ser Val Ser Tyr
1 5

<210> SEQ ID NO: 5
<211> Longitud: 3
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:
<223> Otra Información: cadena ligera CDR 2 de 1D4

<400> Secuencia: 5

Ala Thr Ser
1

<210> SEQ ID NO: 6
<211> Longitud: 9
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:
<223> Otra Información: cadena ligera CDR 3 de 1D4

<400> Secuencia: 6

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
1 5

<210> SEQ ID NO: 7
<211> Longitud: 118
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:
<223> Otra Información: secuencia de región variable de cadena pesada de 1D4

<400> Secuencia: 7

209
203

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

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

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> SEQ ID NO: 8
<211> Longitud: 106
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:
<223> Otra Información: secuencia de región variable de cadena ligera de 1D4

<400> Secuencia: 8

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

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

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

204 27

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

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

<210> SEQ ID NO: 9
<211> Longitud: 354
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:
<223> Otra Información: secuencia de ADN de secuencia de región variable de
cadena pesada de 1D4

<400> Secuencia: 9
caggtgacgc tgaaggagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60
acttgttctt tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 120
cagccttcag ggaaggggtct ggagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgataagtac 180
tataacacag ccctgaagag cgggctcaca atctccaagg atacctccaa aaaccaggtc 240
ttcctcaaga tcgccagtgt ggacactaca gatactgcca catactactg tgctcgaata 300
gactgggacg ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc ctca 354

<210> SEQ ID NO: 10
<211> Longitud: 318
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:
<223> Otra Información: secuencia de ADN de secuencia de región variable de
cadena ligera de 1D4

<400> Secuencia: 10
cagattgtac tgactcagtc tccagcaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca 60
atgacttgca gggccagctc aagtgttaagt tacatgcact ggtaccagca gaagccagga 120

205
204

tectcccca aaccctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt cctgctcgc 180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcaacagagt ggaggctgaa 240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc cgtggacgtt cggtggaggc 300
accaagctgg agataaaa 318

<210> SEQ ID NO: 11
<211> Longitud: 186
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<220> Característica:
<223> Otra Información: dominio extracelular de OX40 humano (aminoácidos 29-214 de P43489)

<400> Secuencia: 11

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His
1 5 10 15
Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln
20 25 30
Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val
35 40 45
Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly
50 55 60
Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg
65 70 75 80
Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp
85 90 95
Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala
100 105 110
Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln
115 120 125
Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro
130 135 140

206

Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr
145 150 155 160

Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr
165 170 175

Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala
180 185

<210> SEQ ID NO: 12
<211> Longitud: 277
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<220> Característica:
<223> Otra Información: receptor de OX40 humano (P43489)

<400> Secuencia: 12

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
20 25 30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
35 40 45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
50 55 60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
65 70 75 80

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
85 90 95

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
100 105 110

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
115 120 125

208
207

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
130 135 140

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

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
165 170 175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
195 200 205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
210 215 220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
225 230 235 240

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
260 265 270

Thr Leu Ala Lys Ile
275

<210> SEQ ID NO: 13

<211> Longitud: 13

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:

<223> Otra Información: CDR de cadena pesada extendida 1 de 1D4

<400> Secuencia: 13

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp
1 5 10

208
207

<210> SEQ ID NO: 14
<211> Longitud: 19
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:
<223> Otra Información: CDR 2 de cadena pesada extendida de 1D4

<400> Secuencia: 14

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
1 5 10 15

Leu Lys Ser

<210> SEQ ID NO: 15
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:
<223> Otra Información: CDR 3 de cadena pesada extendida de 1D4

<400> Secuencia: 15

Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 16
<211> Longitud: 12
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:
<223> Otra Información: CDR 1 de cadena ligera extendida de 1D4

<400> Secuencia: 16

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 17
<211> Longitud: 11
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:

209

<223> Otra Información: CDR 2 de cadena ligera extendida de 1D4

<400> Secuencia: 17

Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 18

<211> Longitud: 9

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:

<223> Otra Información: CDR 3 de cadena ligera extendida de 1D4

<400> Secuencia: 18

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
1 5

<210> SEQ ID NO: 19

<211> Longitud: 115

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Homo sapiens

<220> Característica:

<223> Otra Información: IGHV2-70*10 humano

<400> Secuencia: 19

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

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

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

Trp Ile Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

209
210

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

Val Ser Ser
115

<210> SEQ ID NO: 20
<211> Longitud: 115
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<220> Característica:
<223> Otra Información: IGHV2-70*01 humano

<400> Secuencia: 20

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

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

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

Trp Leu Ala Leu Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> SEQ ID NO: 21
<211> Longitud: 115

21

<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<220> Característica:
<223> Otra Información: IGHV2-70*13 humano

<400> Secuencia: 21

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

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

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

Trp Leu Ala Leu Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> SEQ ID NO: 22
<211> Longitud: 115
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<220> Característica:
<223> Otra Información: IGHV2-5*09 humano

<400> Secuencia: 22

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

211
212

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

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

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

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> SEQ ID NO: 23
<211> Longitud: 115
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<220> Característica:
<223> Otra Información: IGHV2-70*11 humano

<400> Secuencia: 23

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

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

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

Trp Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

213

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> SEQ ID NO: 24
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<220> Característica:
<223> Otra Información: IGKV3-11*01 humano

<400> Secuencia: 24

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

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

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

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

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

214

<210> SEQ ID NO: 25
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<220> Característica:
<223> Otra Información: IGKV1-39*01 humano

<400> Secuencia: 25

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 Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu 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 Ser Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

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

<210> SEQ ID NO: 26
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<220> Característica:
<223> Otra Información: IGKV1D-39*01 humano

<400> Secuencia: 26

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 Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

214
215

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu 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 Ser Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

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

<210> SEQ ID NO: 27
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<220> Característica:
<223> Otra Información: IGKV3-11*02

<400> Secuencia: 27

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

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

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

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

216

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

<210> SEQ ID NO: 28
<211> Longitud: 108
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<220> Característica:
<223> Otra Información: IGKV3-20*01 humano

<400> Secuencia: 28

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 Pro
85 90 95

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

<210> SEQ ID NO: 29
<211> Longitud: 118
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: dominio variable de cadena pesada de VH1

<400> Secuencia: 29

216
217

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

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

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

Trp Ile Ala Arg Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> SEQ ID NO: 30
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: dominio variable de cadena ligera VL1

<400> Secuencia: 30

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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

218

Tyr Ala Thr 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 Trp Ser Ser Asn Pro Trp
85 90 95

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

<210> SEQ ID NO: 31
<211> Longitud: 720
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH1-VL1 scFv ADNc

<400> Secuencia: 31
cagggtcacac tgaaagagtc tggacccgcc ctggtcaagc ccacccagac actgaccctg 60
acctgcacct tcagcggctt cagcctgagc acaagcggca tgggcgtgtc ctggatcaga 120
cagcctcctg gcaaggccct ggaatggatc gcccgattt ggtgggacga cgacaagtac 180
tacagcacca gcctgaaaac ccggctgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccaggtg 240
gtgctgacca tgaccaacat ggaccccgtg gacaccgcca cctactactg cgccagaatc 300
gactgggacg gcttcgccta ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtgtc tagcggaggc 360
ggaggatctg gcggcggagg aagtggcgga ggggatctg agatcgtgct gacacagagc 420
cccgccaccc tgtctctgag ccctggcgaa agagccaccc tgagctgtag agccagcagc 480
agcgtgtcct actacctggc ctggtatcag cagaagcccg gccaggctcc ccggctgctg 540
atctacgcca ccagcaatcg ggccacaggc atccctgcca gatcttctgg cagcggctcc 600
ggcaccgact tcaccctgac catctccagc ctggaacccg aggacttcgc cgtgtactac 660
tgccagcagt ggtccagcaa cccctggaca tttggccagg gcaccaaggt ggaaatcaag 720

<210> SEQ ID NO: 32
<211> Longitud: 448
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

219

<220> Característica:

<223> Otra Información: IGHG1 de cadena pesada de VH1

<400> Secuencia: 32

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

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

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

Trp Ile Ala Arg Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

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

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

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

219
220

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

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

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

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

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

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

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

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

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

721

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

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

<210> SEQ ID NO: 33
<211> Longitud: 448
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: IGHG1 de cadena pesada de VH2

<400> Secuencia: 33

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

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

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

Trp Ile Ala Arg Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

221
277

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

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

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

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

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

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

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

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

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

2222

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

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

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

<210> SEQ ID NO: 34
<211> Longitud: 448
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: IGHG1 de cadena pesada de VH3

<400> Secuencia: 34

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

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

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

224

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

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

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

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

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

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

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

225

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

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

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

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

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

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

<210> SEQ ID NO: 35
<211> Longitud: 448
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: IGHG1 de cadena pesada de VH4

<400> Secuencia: 35

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

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

226

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

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

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

226
227

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

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

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

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

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

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

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

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

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

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

228

<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: IGHG1 de cadena pesada de VH5

<400> Secuencia: 36

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

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

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

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

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

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

728
229

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

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

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

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

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

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

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

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

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

226
230

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

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

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

<210> SEQ ID NO: 37
<211> Longitud: 448
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: IGHG1 de cadena pesada de VH6

<400> Secuencia: 37

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

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

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

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

230
231

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

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

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

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

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

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

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

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

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

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

232

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

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

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

<210> SEQ ID NO: 38
<211> Longitud: 448
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: IGHG1 de cadena pesada de VH7

<400> Secuencia: 38

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

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

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

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

29/2
23

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

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

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

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

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

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

234

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

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

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

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

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

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

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

<210> SEQ ID NO: 39
<211> Longitud: 214
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: cadena ligera de VL1

<400> Secuencia: 39

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

235

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

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

Tyr Ala Thr 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 Trp Ser Ser Asn Pro Trp
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> SEQ ID NO: 40
<211> Longitud: 214

1
230

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: cadena ligera de VL2

<400> Secuencia: 40

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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

Tyr Ala Thr 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 Trp Ser Ser Asn Pro Trp
85 90 95

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

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

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

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

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

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

236
238

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> SEQ ID NO: 41
<211> Longitud: 214
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: cadena ligera de VL3

<400> Secuencia: 41

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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

227
238

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> SEQ ID NO: 42
<211> Longitud: 214
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: cadena ligera de VL4

<400> Secuencia: 42

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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

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

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

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

238
239

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> SEQ ID NO: 43
<211> Longitud: 214
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: cadena ligera de VL5

<400> Secuencia: 43

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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

238
240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> SEQ ID NO: 44
<211> Longitud: 214
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: cadena ligera de VL6

248

241

<400> Secuencia: 44

Gln 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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

242

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> SEQ ID NO: 45
<211> Longitud: 213
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: cadena ligera de VL7

<400> Secuencia: 45

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 Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro 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

243

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> SEQ ID NO: 46
<211> Longitud: 213
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: cadena ligera de VL8

<400> Secuencia: 46

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 Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

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

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

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

247
244

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> SEQ ID NO: 47
<211> Longitud: 213
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: cadena ligera de VL9

<400> Secuencia: 47

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 Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

2448
245

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro 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

<210> SEQ ID NO: 48
<211> Longitud: 213
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: cadena ligera de VL10

<400> Secuencia: 48

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

246

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

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

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

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro 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

<210> SEQ ID NO: 49
<211> Longitud: 213

246
247

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: cadena ligera de VL11

<400> Secuencia: 49

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 Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro 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

247
248

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> SEQ ID NO: 50
<211> Longitud: 448
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: cadena pesada de quimera 1D4

<400> Secuencia: 50

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

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

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

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

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

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

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

249

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

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

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

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

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

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

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

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

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

249
250

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

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

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

<210> SEQ ID NO: 51
<211> Longitud: 213
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: cadena ligera de quimera 1D4

<400> Secuencia: 51

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

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

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

257

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> SEQ ID NO: 52
<211> Longitud: 191
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Rattus norvegicus

<220> Característica:
<223> Otra Información: dominio extracelular de OX40 de rata

<400> Secuencia: 52

Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His
1 5 10 15

Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys
20 25 30

251
252

Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His Pro Cys Glu Pro Gly Phe Tyr
35 40 45

Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys Thr Gln Cys Asn
50 55 60

His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr Pro Thr Glu Asp
65 70 75 80

Thr Val Cys Gln Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln Asp Ser Ser
85 90 95

His Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser
100 105 110

Pro Gly Ser Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ser
115 120 125

Gly Lys Gln Ile Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp Thr Val Cys
130 135 140

Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr Gln Arg Thr
145 150 155 160

Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp Pro Arg Thr
165 170 175

Ser Gln Leu Pro Ser Thr Pro Thr Leu Val Ala Pro Glu Gly Pro
180 185 190

<210> SEQ ID NO: 53
<211> Longitud: 191
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: quimera RHRR de dominio extracelular de OX40 de humano-rata

<400> Secuencia: 53

Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His
1 5 10 15

252
253

Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys
20 25 30

Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr
35 40 45

Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn
50 55 60

Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp
65 70 75 80

Thr Val Cys Gln Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln Asp Ser Ser
85 90 95

His Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser
100 105 110

Pro Gly Ser Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ser
115 120 125

Gly Lys Gln Ile Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp Thr Val Cys
130 135 140

Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr Gln Arg Thr
145 150 155 160

Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp Pro Arg Thr
165 170 175

Ser Gln Leu Pro Ser Thr Pro Thr Leu Val Ala Pro Glu Gly Pro
180 185 190

<210> SEQ ID NO: 54
<211> Longitud: 190
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: quimera RHHH de dominio extracelular de OX40 de humano-rata

254

<400> Secuencia: 54

Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His
1 5 10 15

Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys
20 25 30

Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr
35 40 45

Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn
50 55 60

Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp
65 70 75 80

Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys
85 90 95

Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly
100 105 110

Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys
115 120 125

His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp
130 135 140

Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala
145 150 155 160

Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln
165 170 175

Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala
180 185 190

<210> SEQ ID NO: 55
<211> Longitud: 187
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

254

<220> Característica:
<223> Otra Información: quimera HHRR de dominio extracelular de OX40 de humano-rata

<400> Secuencia: 55

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

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln
20 25 30

Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val
35 40 45

Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly
50 55 60

Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Gln
65 70 75 80

Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln Asp Ser Ser His Lys Leu Gly
85 90 95

Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Ser Asn
100 105 110

Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ser Gly Lys Gln Ile
115 120 125

Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp Thr Val Cys Glu Asp Arg Ser
130 135 140

Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr Gln Arg Thr Thr Phe Arg Pro
145 150 155 160

Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp Pro Arg Thr Ser Gln Leu Pro
165 170 175

Ser Thr Pro Thr Leu Val Ala Pro Glu Gly Pro
180 185

256

<210> SEQ ID NO: 56
<211> Longitud: 189
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: quimera RRHH de dominio extracelular de OX40 de humano-rata

<400> Secuencia: 56

Val	Thr	Val	Lys	Leu	Asn	Cys	Val	Lys	Asp	Thr	Tyr	Pro	Ser	Gly	His	
1				5					10					15		
Lys	Cys	Cys	Arg	Glu	Cys	Gln	Pro	Gly	His	Gly	Met	Val	Ser	Arg	Cys	
			20					25					30			
Asp	His	Thr	Arg	Asp	Thr	Val	Cys	His	Pro	Cys	Glu	Pro	Gly	Phe	Tyr	
		35					40					45				
Asn	Glu	Ala	Val	Asn	Tyr	Asp	Thr	Cys	Lys	Gln	Cys	Thr	Gln	Cys	Asn	
	50					55					60					
His	Arg	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Gln	Asn	Cys	Thr	Pro	Thr	Glu	Asp	
65					70					75					80	
Thr	Val	Cys	Arg	Cys	Arg	Ala	Gly	Thr	Gln	Pro	Leu	Asp	Ser	Tyr	Lys	
				85					90					95		
Pro	Gly	Val	Asp	Cys	Ala	Pro	Cys	Pro	Pro	Gly	His	Phe	Ser	Pro	Gly	
			100					105					110			
Asp	Asn	Gln	Ala	Cys	Lys	Pro	Trp	Thr	Asn	Cys	Thr	Leu	Ala	Gly	Lys	
		115					120					125				
His	Thr	Leu	Gln	Pro	Ala	Ser	Asn	Ser	Ser	Asp	Ala	Ile	Cys	Glu	Asp	
		130				135					140					
Arg	Asp	Pro	Pro	Ala	Thr	Gln	Pro	Gln	Glu	Thr	Gln	Gly	Pro	Pro	Ala	
145					150					155					160	
Arg	Pro	Ile	Thr	Val	Gln	Pro	Thr	Glu	Ala	Trp	Pro	Arg	Thr	Ser	Gln	
				165					170					175		

256
257

Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg
180 185

<210> SEQ ID NO: 57
<211> Longitud: 445
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: IGHG4 S228P de cadena pesada de VH6

<400> Secuencia: 57

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

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

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

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

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

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

257

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

258
259

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

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

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

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> SEQ ID NO: 58

<211> Longitud: 118

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: dominio variable de cadena pesada de VH6

<400> Secuencia: 58

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

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

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

260

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> SEQ ID NO: 59
<211> Longitud: 118
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: dominio variable de cadena pesada de VH7

<400> Secuencia: 59

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

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

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> SEQ ID NO: 60
<211> Longitud: 106
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

261

<220> Característica:
<223> Otra Información: dominio variable de cadena ligera de VL9
<400> Secuencia: 60

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

<210> SEQ ID NO: 61
<211> Longitud: 354
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: secuencia codificante de ADN de dominio variable de cadena pesada de VH6

<400> Secuencia: 61
caggtcacac tgaaagagtc tggacccgcc ctggtcaagc ccacccagac actgaccctg 60
acctgcagct tcagcggcctt cagcctgagc acaagcggca tgggcgtggg ctggatcaga 120
cagcctcctg gcaaggccct ggaatggatc gcccatattt ggtgggatga tgataaatat 180
tataacaccg cctgaaaac ccgcctgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccaggtg 240
gtgctgacca tgaccaacat ggaccccgtg gacaccgcca cctactactg cgccagaatc 300

262

gactgggacg gcttcgccta ttggggccag ggaaccctgg tgaccgtgag cagc 354

<210> SEQ ID NO: 62
<211> Longitud: 354
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: secuencia codificante de ADN de dominio variable de cadena pesada de VH7

<400> Secuencia: 62
cagggtcacac tgaagagtc tggacccgcc ctggtcaagc ccaccagac actgaccctg 60
acctgcagct tcagcggctt cagcctgagc acaagcggca tgggcgtggg ctggatcaga 120
cagcctcctg gcaaggccct ggaatggctc gccacattt ggtgggatga tgataaatat 180
tataacaccg ccctgaaaac ccgcctgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccaggtg 240
gtgctgacca tgaccaacat ggaccccgctg gacaccgcca cctactactg cgccagaatc 300
gactgggacg gcttcgccta ttggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc 354

<210> SEQ ID NO: 63
<211> Longitud: 318
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: secuencia codificante de ADN de dominio variable de cadena ligera de VL9

<400> Secuencia: 63
gagatcgtgc tgacacagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga aagagccacc 60
ctgagctgta gagccagcag cagcgtgtcc tacatgact ggtatcagca gaagcccggc 120
caggcgccgc gcccgctggat ttatgcgacc agcaatcggg ccacaggcat ccctgccaga 180
ttttctggca gcggctccgg caccgactac accctgacca tctccagcct ggaacccgag 240
gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg tccagcaacc cctggacatt tggccagggc 300
accaaagtgg aaattaaa 318

<210> SEQ ID NO: 64
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Mus musculus

262
263

<220> Característica:
<223> Otra Información: CDR 1 de cadena pesada de VH6

<400> Secuencia: 64

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 65
<211> Longitud: 7
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:
<223> Otra Información: CDR 2 de cadena pesada de VH6

<400> Secuencia: 65

Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> SEQ ID NO: 66
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:
<223> Otra Información: CDR 3 de cadena pesada de VH6

<400> Secuencia: 66

Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 67
<211> Longitud: 5
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:
<223> Otra Información: CDR 1 de cadena ligera de VL9

<400> Secuencia: 67

Ser Ser Val Ser Tyr
1 5

<210> SEQ ID NO: 68
<211> Longitud: 3
<212> Tipo: PRT

267
264

<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:

<223> Otra Información: CDR 2 de cadena ligera de VL9

<400> Secuencia: 68

Ala Thr Ser
1

<210> SEQ ID NO: 69

<211> Longitud: 9

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:

<223> Otra Información: CDR 3 de cadena ligera de VL9

<400> Secuencia: 69

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
1 5

<210> SEQ ID NO: 70

<211> Longitud: 13

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:

<223> Otra Información: CDR 1 de cadena pesada extendida de VH6

<400> Secuencia: 70

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 71

<211> Longitud: 19

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: CDR 2 de cadena pesada extendida de VH6

<400> Secuencia: 71

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
1 5 10 15

Leu Lys Thr

284
265

<210> SEQ ID NO: 72
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:
<223> Otra Información: CDR 3 de cadena pesada extendida de VH6

<400> Secuencia: 72

Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 73
<211> Longitud: 12
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:
<223> Otra Información: CDR 1 de cadena ligera extendida de VL9

<400> Secuencia: 73

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 74
<211> Longitud: 11
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: CDR 2 de cadena ligera extendida de VL9

<400> Secuencia: 74

Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 75
<211> Longitud: 9
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:
<223> Otra Información: CDR 3 de cadena ligera extendida de VL9

<400> Secuencia: 75

25
266

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
1 5

<210> SEQ ID NO: 76
<211> Longitud: 44
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<220> Característica:
<223> Otra Información: módulo 2 de dominio extracelular de OX40 humano

<400> Secuencia: 76

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
1 5 10 15

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
20 25 30

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg
35 40

<210> SEQ ID NO: 77
<211> Longitud: 118
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: dominio variable de cadena pesada de VH2

<400> Secuencia: 77

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

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

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

Trp Ile Ala Arg Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val

[illegible]

```
<210> SEQ ID NO: 78
<211> Longitud: 118
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: dominio variable de cadena pesada de VH3

<400> Secuencia: 78
```

[illegible]

268
268

115

<210> SEQ ID NO: 79
<211> Longitud: 118
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: dominio variable de cadena pesada de VH4

<400> Secuencia: 79

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

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

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> SEQ ID NO: 80
<211> Longitud: 118
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: dominio variable de cadena pesada de VH5

<400> Secuencia: 80

468
269

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

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

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> SEQ ID NO: 81
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: dominio variable de cadena ligera de VL2

<400> Secuencia: 81

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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

268
270

Tyr Ala Thr 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 Trp Ser Ser Asn Pro Trp
85 90 95

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

<210> SEQ ID NO: 82
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: dominio variable de cadena ligera de VL3

<400> Secuencia: 82

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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

270
271

<210> SEQ ID NO: 83
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: dominio variable de cadena ligera de VL4

<400> Secuencia: 83

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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> SEQ ID NO: 84
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: dominio variable de cadena ligera de VL5

<400> Secuencia: 84

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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr

271
272

20 25 30

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

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

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

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

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

<210> SEQ ID NO: 85
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: dominio variable de cadena ligera de VL6

<400> Secuencia: 85

Gln 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 Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp

222
223

85

90

95

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

<210> SEQ ID NO: 86
<211> Longitud: 106
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: dominio variable de cadena ligera de VL7

<400> Secuencia: 86

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 Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> SEQ ID NO: 87
<211> Longitud: 106
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: dominio variable de cadena ligera de VL8

<400> Secuencia: 87

283
274

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 Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> SEQ ID NO: 88
<211> Longitud: 106
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: dominio variable de cadena ligera de VL10

<400> Secuencia: 88

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 Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

274
275

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

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

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

<210> SEQ ID NO: 89
<211> Longitud: 106
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: dominio variable de cadena ligera de VL11

<400> Secuencia: 89

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 Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

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

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

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

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

276

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0014855

Bogotá D.C., Febrero 07 de 2014 - 14:21:19

RECIBIDO DE : CASTILLO GRAU & ASOCIADOS LTDA.

NI 800.098.704

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	610510714	07/02/2014	3.492.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-026118- -00000-0000

Fecha: 2014-02-07 14:30:30
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR. NUEVAS CR
Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 276 277

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

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

, Febrero 7 de 2014 - 14:21:19

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐

Indicación que se solicita una PCT

☐

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐