



CSA850799

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



BT
Organización y
Digitalización CSA Ltda

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones



SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA NACIONAL

09-103883

1. EXPEDIENTE No.

ANTICUERPOS OX40 ANTAGONISTAS Y SU USO EN EL TRATAMIENTO

4. TITULO

DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS Y AUTOINMUNES

5. CLASIFICACION INTERNACIONAL

7. SOLICITANTE

GENENTECH, INC.

DOMICILIO

SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

14. APODERADO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. SANTAFE DE BOGOTÀ, D.C.

PETITORIO

AS: 111.299



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-103883-00000-0000

Fecha: 2009-09-23 17:21:01

Dep. 2020 NUECREACIONI

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 271

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: GENENTECH, INC.

Dirección: 1 Dna Way, South San Francisco,
California 94080, USNacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de
América

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Calle 70A #4 - 41
Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200

Fax: 742-2200

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número 80.410.337 TP 57492

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Salah-eddine LAMHAMED-CHERRADI, Zhengbin YAO, Sanjaya SINGH.

Dirección: 2217 Rocky Cove Court Pearland, TX 77584, US; 2002 Stanwich Drive Berwyn,
PA 19312, US; 4 Owl Ridge Lane Sandy Hook, CT 06482, US (Respectivamente).

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/US2008/002498

Fecha

26.02.2008

Publicación Internacional No

WO 2008/106116 A3

Fecha

04.09.2008

6 Título (54): ANTICUERPOS OX40 ANTAGONISTAS Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES INFLAMATORIAS Y AUTOINMUNES

7 Clasificación Internacional (51):

8 Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒NO ☐

US

27.02.2007

60/903,693

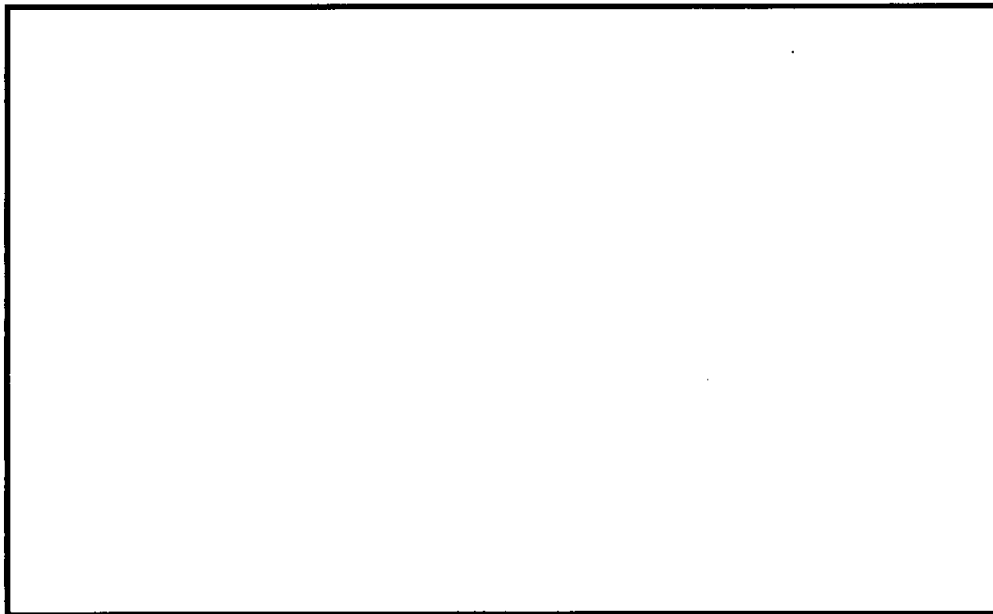
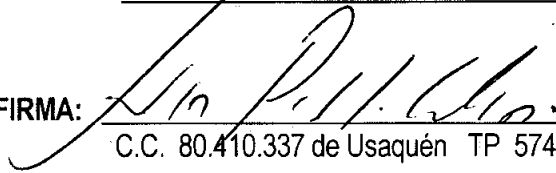
9 Comprobante de pago No. 09-59.512; 09-40.687; 09-50.556; 09-53.695; 09-52.409

Fecha 23-09-2009

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

P102-F06 (2008-06-09)

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 540.000
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia autenticada**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de Reivindicaciones adicionales \$ 825.000 (33*\$25.000)

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:**12** Solicito la concesión de la patente,NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTOFIRMA: C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

111299

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-103883- -00000-0000

Fecha: 2009-09-23 17:21:01 Dep. 2020 NUECREACIONE
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 271

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 59,512
 CHA : AGOSTO 11 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

POSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
IGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	303324906	11/08/2009	21,756,320.00

***** CONCEPTO *****

NT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
	TOTAL :	\$ 540,000.00

N: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

SPONSABLE : _____

111 299

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 40,687

FECHA : JUNIO 3 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-103883- -00000-0000

Fecha: 2009-09-23 17:21:01 Dep. 2020 NUECREACIONE
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 271

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
VIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	114276945	02/06/2009	35,529,080.00

***** CONCEPTO *****

INT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
		TOTAL :
		\$ 500,000.00

EN: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
 COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
 SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

111 299

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 50,556
FECHA : JULIO 9 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-103883-00000-0000

Fecha: 2009-09-23 17:21:01 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 271

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	104946170	08/07/2009	24,289,960.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL :
			\$ 250,000.00

SON: DOSCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

111 299

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-103883- -00000-0000

Fecha: 2009-09-23 17:21:01 Dep. 2020 NUECREACION
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 271

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 53,695
 FECHA : JULIO 22 DE 2009

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	104946236	22/07/2009	27,078,480.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	50,000.00
99		OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	50,000.00
TOTAL :			\$ 50,000.00

SON: CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

111 299

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 52,409
FECHA : JULIO 16 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-103883- -00000-0000

Fecha: 2009-09-23 17:21:01
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONE
Eva: 378 FASENACIONALI
Folios: 271

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	104946181	15/07/2009	20,332,080.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAM	25,000.00
	TOTAL :	25,000.00

SDN: VEINTICINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
4 September 2008 (04.09.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/106116 A3

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/002498

(22) International Filing Date:
26 February 2008 (26.02.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/903,693 27 February 2007 (27.02.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): LAMHAMEDICHERRADI, Salah-eddine [MA/US]; 2217 Rocky Cove Court, Pearland, TX 77584 (US). YAO, Zhengbin [US/US]; 2002 Stanwich Drive, Berwyn, PA 19312 (US). SINGH, Sanjaya [US/US]; 4 Owl Ridge Lane, Sandy Hook, CT 06482 (US).

(74) Agents: CORUZZI, Laura, A. et al.; Jones Day, 222 East 41st Street, New York, NY 10017-6702 (US).

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

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

Published:

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

(88) Date of publication of the international search report:
16 October 2008

(54) Title: ANTAGONIST OX40 ANTIBODIES AND THEIR USE IN THE TREATMENT OF INFLAMMATORY AND AUTOIMMUNE DISEASES

(57) Abstract: The present invention relates to antagonist antibodies directed against human OX40 receptor (CD 134) and fragments thereof, including the amino acid sequences of antagonist antibodies and the nucleic acids that encode the antibodies. Also included in the present invention are antigen binding regions (CDRs) derived from the light and/or heavy chain variable regions of said antibodies. Another aspect of the present invention is the use of anti-OX40 antagonist antibodies in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases. The present invention also relates to humanized sequences of an antagonist antibody A10 and epitope mapping of the binding site of the antibody.

WO 2008/106116 A3

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
4 de septiembre de 2008 (4.09.2008)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2008/106116 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 16/28 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) No. Solicitud Internacional:
PCT/US2008/002498

(22) Fecha de Presentación Internacional:
26 de febrero de 2008 (26.02.2008)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:
60/903,693 27 de febrero de 2007 (27.02.2007) EU

(71) Solicitante (para todos los países destinatarios con
excepción de EU): **GENENTECH, INC.** [EU/EU]; 1
DNA Way, South San Francisco, California 94080
(EU).

Inventores, e

(72) Inventores/Solicitantes (para US únicamente):

(75) **LAMHAMEDI-CHERRADI, Salah-eddine** [EU/EU];
Salah-eddine; 2217 Rocky Cove Court Pearland, TX
77584 (EU). **YAO, Zhengbin** [EU/EU]; YAO,
Zhengbin; 2002 Stanwich Drive Berwyn, PA 19312
(EU). **SINGH, Sanjaya** [EU/EU]; SINGH, Sanjaya; 4
Owl Ridge Lane Sandy Hook, CT 06482 (EU).

(74) Agente: **ORUZZI, Laura, A. et al.**; Jones Day, 222
East 41st Street, New York, NY 10017-6702 (EU).

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

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

Publicado:

- con el informe internacional de búsqueda.
- antes de la fecha límite de expiración para reivindicaciones
modificadas y a ser republicado nuevamente en el evento de
recibirlos
- con el listado de secuencias como parte de la descripción
publicada separadamente en forma electrónica y disponible bajo
requerimiento de la Oficina Internacional.

(88) Fecha de publicación del informe de búsqueda
internacional:

16 de octubre de 2008

(54) Título: **ANTICUERPOS OX40 ANTAGONISTAS Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
INFLAMATORIAS Y AUTOINMUNES**

(57) Extracto: La presente invención es concerniente con anticuerpos antagonistas dirigidos contra el receptor OX40 humano (CD 134) y fragmentos del mismo, en los que se incluyen las secuencias de aminoácidos de anticuerpos antagonistas y los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos. También incluidos en la presente invención se encuentran regiones de enlace de antígeno (CDR) derivadas de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada de dichos anticuerpos. Otro aspecto de la presente invención es el uso de anticuerpos antagonistas anti-OX40 en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. La presente invención también es concerniente con secuencias humanizadas de un anticuerpo antagonista AIO y mapeo de epítipo del sitio de enlace del anticuerpo.

8

**ANTICUERPOS OX40 ANTAGONISTAS Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES INFLAMATORIAS Y AUTOINMUNES**

CAMPO DE LA INVENCION

5 Se proporcionan en la presente anticuerpos que se
enlazan inmuno-específicamente a un polipéptido de OX40
humano, un fragmento de polipéptido de OX40 u otro epítipo
de OX40. La invención también es concerniente con
anticuerpos humanizados que se enlazan
10 inmuno-específicamente a un polipéptido de OX40 humano, un
fragmento de polipéptido de OX40 o epítipo de OX40. También
se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican
anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un
polipéptido de OX40, fragmento de polipéptido de OX40 o
15 epítipo de OX40. La invención proporciona además vectores y
células huésped que comprenden ácidos nucleicos que
codifican ácidos nucleicos que se enlazan
inmuno-específicamente a un polipéptido de OX40 humano,
fragmento de polipéptido de OX40 o epítipo de OX40, también
20 como métodos para fabricar los anticuerpos. También se
proveen métodos para usar los anticuerpos anti-OX40
provistos en la presente para inhibir la actividad
biológica de un OX40 y/o para tratar o prevenir una
enfermedad moderada por OX40.

25

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Nuestro sistema inmune defiende nuestro cuerpo
contra patógenos extraños, una función que requiere un

equilibrio de activación inmune contra agentes extraños y tolerancia a tejidos propios. Las infecciones agudas provocadas por, por ejemplo, un patógeno viral, inducen dos tipos de memoria a largo plazo: inmunidad humoral, en la cual los B-linfocitos (células B) producen anticuerpos para impedir la infección por estos patógenos extraños e inmunidad celular, en la cual T-linfocitos (células T) activadas por antígenos específicos exterminan las células infectadas y también producen citoquinas. Las células T funcionan principalmente en inmunidad célula-moderada y comprenden aproximadamente el 70% de los linfocitos. La mayoría de las células T son células T "auxiliares" CD4+ y están involucradas principalmente en la activación de células B y macrófagos. Las células T CD8+ o linfocitos T citotóxicos (CTL) están involucradas en reacciones citotóxicas célula-moderadas que comprenden aproximadamente el 35% de la población de células T. Las células T pueden ser divididas en tres poblaciones distintas: células naturales, efectoras y de memoria. Las células T naturales son activadas y se convierten en células efectoras en presencia de antígeno. Las moléculas de clase I de complejo de histocompatibilidad mayor (Clase I MHC) juegan un papel principal en esta respuesta efectora al "presentar" antígenos de invadir patógenos a receptores de célula T, que a su vez reconocen los patógenos y los atacan.

Muchas interacciones receptor-ligando están involucradas en la inducción, establecimiento y modulación de respuestas inmunes dirigidas contra antígenos extraños. Por lo menos dos señales son necesarias para activar una

respuesta de célula T de CD4+ o CD8+ a un antígeno. La primera señal es administrada por medio del receptor de célula T (TCR) mediante un antígeno enlazado a una molécula de clase I o clase II de histocompatibilidad mayor (MHC) sobre la superficie de una célula que presenta antígeno (APC). La segunda señal involucra el enlace de un ligando presente sobre la superficie de la APC a una segunda molécula receptora sobre la superficie de la célula T. Esta segunda señal es denominada co-estimulación y el ligando de APC es denominado frecuentemente como una molécula co-estimuladora (Lenschow, et al., *Annu. Rev Immunol* 14: 233 (1996)). Las moléculas de señalización co-estimuladoras incluyen los miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas, miembros de la superfamilia de receptor de factor de necrosis de tumor (TNFR) y receptores de citoquina (véase revisión de Croft, *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 265 (2003); Kroczeck, et al., *J Allergy Clin Immunol* 116: 906 (2005)). En combinación, las dos señales activan la célula T, que a su vez segrega citoquinas y prolifera.

Un ejemplo de una molécula co-estimuladora es el receptor OX40 (CD134), un miembro de la superfamilia de TNFR, que está enlazado a la membrana y es expresado principalmente sobre células T CD4+ activadas (esto es, en sitios de inflamación) (Paterson, et al., *Mol Immunol* 24: 1281 (1987)). El ligando (OX40L) es una proteína de membrana tipo II perteneciente a la familia de TNF y es expresado sobre células que presenten antígenos, tales como células B activadas, células dendríticas y células endoteliales (Stuber, et al., *Immunity* 2: 507 (1995);

Weinberg, et al., *J Immunol* 162: 1818 (1999); Nohara et al., *J Immunol* 162: 2108 (2001); Malmstrom, et al., *J Immunol* 166: 6972 (2001)). La señalización por medio del receptor de OX40 (de aquí en adelante en la presente

5 "OX40") es coestimuladora a las células T efectoras y provoca la proliferación de células T (Weinberg, *J Immunol* 152: 4712 (1994), véase revisión de Watts, *Annu Rev Immunol* 23: 23 (2005)). Estudios de OX40 sugieren que su papel principal es determinar el número de células T efectoras

10 que se acumulan en respuestas inmunes primarias y consecuentemente para gobernar el número de células T de memoria que se desarrollan subsecuentemente y sobreviven (véase revisión de Croft, *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 265 (2003)).

15 Un número de estudios *in vitro* han demostrado que OX40 proporciona una señal co-estimuladora dando como resultado proliferación de células T mejoradas y producción de citoquinas (Baum PR et al., *EMBO J*, 1994; Akiba H et al., *Biochem. Biophysic Res*, 1998). Se ha sugerido que en

20 ciertas circunstancias la interacción de OX40/OX40L puede jugar un papel preferencial en el desarrollo de células Th2 (Ohshima, et al., *Blood* 92: 3338 (1998); Flunn, et al., *J Exp Med* 188: 297 (1998)). Cuando la activación inmune es excesiva o es incontrolada, se puede presentar alergia

25 patológica, asma, inflamación, enfermedades autoinmunes y otras enfermedades relacionadas. En tales instancias, la activación y diferenciación de células T juegan un papel importante. Debido a que OX40 funciona para mejorar respuestas inmunes, puede exacerbar las enfermedades

autoinmunes e inflamatorias. La interacción de OX40-OX40L ha sido implicada en la patogénesis de varios modelos de enfermedad. Un gran cuerpo de evidencia sugiere que la interacción de OX40-OX40L juega un papel importante en

5 alergia, asma y enfermedades anunciadas con autoinmunidad e inflamación, que incluyen esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de intestino inflamatorio, enfermedad de inserto contra huésped, encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), leishamiasis experimental,

10 artritis colágeno-inducida, colitis (tal como colitis ulcerativa), reacciones de hipersensibilidad al contacto, diabetes, enfermedad de Crohn y enfermedad de Grave (Arestides, et al., *Eur J Immunol* 32: 2874 (2002); Jember, et al., *J Exp Med* 193: 387 (2001); Kiczek, et al., *J*

15 *Allergy Clin Immunol* 116: 906 (2005); Pakala, et al., *Eur J Immunol* 34: 3039 (2004); Xiaoyan, et al., *CLin Exp Immunol* 143: 110 (2006); Weinberg, et al., *J Immunol* 152: 4712 (1994); Weinberg, et al., *Nat Med* 2: 183 (1996); Malmstrom, et al., *J Immunol* 166: 6972 (2001); Higgins, et al., *J*

20 *Immunol* 162: 486 (1999); Akiba, et al., *J Exp Med* 191: 375 (2000); Stuber, et al., *Gastroenterology* 115: 1205 (1998); Tsukada, et al., *Blood* 95: 2434 (2000); Yoshioka, et al., *Eur J Immunol* 30: 2815 (2000); Stuber, et al., *Eur J Clin Invest* 30: 594 (2000); Bossowski, et al., *J Pediatr Endocrinol Metab* 18: 1365 (2005); véase revisión de Watts, *Annu Rev Immunol* 23: 23 (2005)).

Las terapias actuales para la enfermedad autoinmune e inflamatoria incluyen la administración a largo plazo de esteroides solos o en combinación con

fármacos y/o biológicos citotóxicos. Anticuerpos contra TNF- α están actualmente siendo prescritos para un número de enfermedades, en los que se incluyen artritis reumatoide, enfermedad de Crohn y enfermedad inflamatoria del intestino. Además, una nueva terapia experimental en evaluación clínica es una proteína de fusión CTLA4-Ig (antígeno-4 linfocito T citotóxico asociado en forma soluble) para artritis reumatoide. A pesar de estas alternativas, la mayoría de las terapias inmunosupresoras provocan efectos secundarios serios, en los que se incluyen el estado inmunocomprometido del paciente. Idealmente, el tratamiento de enfermedades moderadas por células T apuntaría a las células que provocan la enfermedad [antígeno-específica] pero evitaría el resto del repertorio de células T (Weinberg, *Trends Immunol* 23: 102 (2002)). Por consiguiente, hay una fuerte necesidad de terapias alternativas para enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

Además de estos métodos, muchos anticuerpos anti-OX40 agonistas han sido desarrollados que estimulan al receptor a incrementar la población de células T. El primer anticuerpo monoclonal (mAb) anti-OX40 publicado, MRX OX-40, era un anticuerpo de ratón que identificaba el receptor como un antígeno de superficie celular sobre células T activadas de CD4+ de rata (Paterson, et al., *Mol Immunol* 24: 1281 (1987)). El anticuerpo tiene un efecto moderado en estimular análisis de proliferación de células T. Desde entonces, muchos mAb anti-OX40 agonistas han sido producidos y usados para reforzar la respuesta inmune (Weatherill, et al., *Cell Immunol* 209:63 (2001); Banal-

Pakala, et al., *Nat Med* 7: 907 (2001); De Smedt, et al., *J Immunol* 168: 661 (2002); Pan, et al., *Mol Ther* 6: 528 (2002); Curti, et al., *Blood* 101: 568 (2003); Nakae, et al., *Proc Natl Acad Sci, EUA* 100: 5986 (2003); Lustgarten, et al., *Eur J Immunol* 34: 752 (2004); So, et al., *J Immunol* 172: 4292 (2004); Koga, et al., *Cancer Sci* 95: 411 (2004); Lanthrop, et al., *J Immunol* 172: 6735 (2004); Polymenidou, et al., *Proc Natl Acad Sci, EUA* 101 Suplemento 2: 14670 (2004); Lustharten, et al., *J Immunol* 173: 4510 (2004); Valzasina, et al., *Blood* 105: 2845 (2005); Cuadros, et al., *Int J Cancer* 116: 934 (2005); Sharma, et al., *Exp Gerontol* 41: 78 (2006)). Sin embargo, en las enfermedades autoinmunes e inflamatorias mencionadas previamente, la estimulación de la población de células T no es el resultado deseado.

Una terapia es bloquear la señalización de OX-40-OX40L por medio del uso de anticuerpos anti-OX40L. Un número de anticuerpos monoclonales mAb que apuntan al OX40L han sido generados y probados para elucidar la ruta de señalización de OX40, sus efectos sobre otras rutas y el papel de OX40 en varias enfermedades (véase, por ejemplo, Blazar, et al., *Blood* 101: 3741 (2003); Ukyo, et al., *Immunology* 109: 226 (2003); Wang, et al., *Tissue Antigens* 64: 566 (2004); Chou, et al., *J Immunol* 174: 436 (2005)). Otros métodos para inhibir la señal de OX40 incluyen el uso de inmunotoxinas anti-OX40, proteínas de fusión de OX-40-IgG y liposomas de OX40 (Weinberg, et al., *Nat Med* 2: 193 (1996); Higgins, et al., *J Immunol* 162: 486 (1999); Satake, et al., *Biochem Biophys Res Commun* 270: 1041 (2000);

17

Taylor, et al., *J Leukoc Biol* 72: 522 (2002); Boot, et al.,
Arthritis Res Ther 7: R604 (2005)).

Una alternativa para apuntar el ligando es desarrollar una terapia dirigida contra el receptor de OX40
5 (CD134). Ha habido intentos por generar un antagonista contra el anticuerpo anti-OX40. Stuber y colegas utilizaron un anticuerpo OX40 anti-ratón de conejo policlonal para inhibir la interacción entre OX40 y OX40L (*J Exp Med* 183: 979 (1996)). Imura, et al., produjeron anticuerpos OX40
10 anti-ratón 131 y 315, que inhibieron la adhesión de células T CD4+ a células endoteliales vasculares y la proliferación de células T, procesos moderados por la ruta de OX40. El anticuerpo OX40 anti-OX40 humano revelado por Weinberg exhibía la habilidad para desplegar las células T CD4+
15 activadas; sin embargo, dependía de la conjugación del anticuerpo a una molécula tóxica, tal como una cadena de Ricino-A (Patente Estadounidense No. 5,759,546). Otros anticuerpos antri-OX40 revelados no tenían ninguna afinidad funcional, tal como el L106 disponible comercialmente.

20 Así, hay necesidad por un verdadero anticuerpo antagonista funcional que apunte a OX40 humano con la capacidad de interferir en la ruta de OX40. Tal anticuerpo tendría el potencial para tratar una plétora de enfermedades que actualmente tienen una gran necesidad sin
25 satisfacer. La presente invención resuelve esta necesidad médica sin satisfacer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención es

12

concerniente con anticuerpos antagonistas dirigidos contra el receptor de OX40 humano (CD134) y fragmentos del mismo. Otra modalidad incluye las secuencias de aminoácidos de anticuerpos antagonistas y los ácidos nucleicos que
5 codifican los anticuerpos.

También incluidas en la presente invención se encuentran regiones de enlace de antígeno (CDR) derivadas de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada de dichos anticuerpos. Los anticuerpos de la invención pueden
10 ser un anticuerpo recombinante. Los anticuerpos de la invención pueden monoclonales y un anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

La presente invención incluye un anticuerpo que
15 comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y/o una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y/o una región
20 variable de cadena ligera (VL) que tiene una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, 15 o 61; una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y/o una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o 16. En una modalidad, el
25 anticuerpo comprende dos CDR de VH que tienen la secuencia de aminoácidos seleccionadas de SEQ ID NO: 17, 18 o 19 y/o dos CDR de VL que tienen la secuencia de aminoácidos seleccionadas de SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 o 61.

La presente invención incluye un anticuerpo que

comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una CDR3 de VH
5 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y/o una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una CDR3 de VL que tiene la
10 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

La presente invención incluye un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; una CDR2 de VH que tiene la
15 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y/o una región variable de cadena ligera (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; una CDR2 de VL
20 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

La presente invención incluye un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que
25 comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y/o una región variable de cadena ligera (VL) que comprende:

una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

5 La presente invención incluye un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una CDR3 de VH
10 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y/o una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una CDR3 de VL que tiene la
15 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

La presente invención incluye un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos revelada en cualquiera de SEQ ID NO: 10 o 11 y/o una región variable de cadena ligera
20 (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos revelada en cualquiera de SEQ ID NO: 7, 8 o 9.

La presente invención incluye un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos revelada en cualquiera de
25 SEQ ID NO: 25, 26 o 27 y/o una región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos revelada en cualquiera de SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23 o 24.

La presente invención incluye un anticuerpo que comprende una VH que tiene la secuencia de aminoácidos

revelada en cualquiera de SEQ ID NO: 10 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos revelada en cualquiera de SEQ ID NO: 7 o 8;

una VH que tiene la secuencia de aminoácidos revelada en
5 cualquiera de SEQ ID NO: 11 y una VL revelada en SEQ ID NO: 9; una VH codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 25 y una VL codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 20 o 21; una VH codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 26 y una
10 VL codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 22, 23 o 24 o una VH codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 27 y una VL codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 22, 23 o 24.

La presente invención incluye un anticuerpo en
15 donde la VH comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEQ ID NO:10 y la VL comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEQ ID NO:7.

La presente invención incluye un anticuerpo en donde la VH comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada
20 en SEQ ID NO:10 y la VL comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEQ ID NO:8.

La presente invención incluye un anticuerpo en donde la VH comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEQ ID NO:11 y la VL comprende la secuencia de
25 aminoácidos ilustrada en SEQ ID NO:9.

La presente invención incluye un anticuerpo en donde la VH es codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibridiza bajo condiciones severas al complemento de una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de

22

aminoácidos de SEQ ID NO:10, 11, 17, 18 o 19 y/o una VL
codificada por una secuencia de nucleótidos que se
hibridiza bajo condiciones severas al complemento de una
secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de
5 aminoácidos de SEQ ID NO:7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16 o 61.

La presente invención incluye un anticuerpo en
donde la VH es codificada por una secuencia de nucleótidos
que se hibridiza bajo condiciones severas al complemento de
una secuencia de nucleótidos como se ilustra en cualquiera
10 de SEQ ID NO:25, 26 o 27 y/o una VL codificada por una
secuencia de nucleótidos que se hibridiza bajo condiciones
severas al complemento de una secuencia de nucleótidos como
se ilustra en cualquiera de SEQ ID NO:20, 21, 22, 23 o 24.

La presente invención incluye un anticuerpo
15 antagonista aislado que se enlaza específicamente a un
epítipo de OX40 humano con una constante de disociación de
entre aproximadamente 1×10^{-12} M a aproximadamente 1×10^{-11}
M, 1×10^{-11} M a aproximadamente 1×10^{-10} M, 1×10^{-10} a
aproximadamente 1×10^{-9} M, 1×10^{-9} a aproximadamente $1 \times$
20 10^{-8} M o 1×10^{-8} a aproximadamente 1×10^{-7} M.

La presente invención incluye una secuencia de VL
que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con
aquella resumida en SEQ ID NO:7 y una secuencia de VH que
tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con
25 aquella resumida en SEQ ID NO: 10.

La presente invención incluye una secuencia de VL
que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con
aquella resumida en SEQ ID NO:8 y una secuencia de VH que
tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con

aquella resumida en SEQ ID NO: 10.

La presente invención incluye una secuencia de VL que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con aquella resumida en SEQ ID NO:9 y una secuencia de VH que
5 tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con aquella resumida en SEQ ID NO: 11.

La presente invención también incluye una molécula de anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 17 (CDR-H1), SEQ ID
10 NO: 18 (CDR-12) y SEQ ID NO: 19 (CDR-H3) y/o una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO:61 (CDR-L1); SEQ ID NO:13 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO:16 (CDR-L3).

La presente invención incluye fragmentos de
15 anticuerpo de enlace de antígeno humanos de los anticuerpos de la presente invención en los que se incluyen, pero no limitados a Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv de una sola cadena (scFv), anticuerpos de una sola cadena, Fv disulfuro-enlazados (sdFv), diacuerpos, triacuerpos o minicuerpos. La
20 invención también incluye anticuerpos de un solo dominio que comprende ya sea un dominio VL o VH.

La presente invención incluye secuencias humanizadas de anticuerpo monoclonal A10(TH)hu336F y variantes del mismo. Ácidos nucleicos que codifican estas
25 variantes incluyen SEQ ID NO: 20-27. A10(TH)hu336F comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 9 y una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 11. La región de cadena pesada variable puede comprender además por lo menos un

2/

dominio de los dominios CH1, CH2 y CH3 de una región constante. La región constante de cadena pesada puede ser un anticuerpo IgG, en donde el anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG1, un anticuerpo IgG2, un anticuerpo IgG3 o
5 un anticuerpo IgG4.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender cualquier secuencia de dominio variable de estructura apropiada, a condición de que la actividad de enlace a OX40 sea retenida sustancialmente. Por ejemplo, en algunas
10 modalidades, los anticuerpos de la invención comprenden una secuencia de consenso de estructura de cadena pesada de sub-grupo III humana. En una modalidad de estos anticuerpos, la secuencia de consenso de estructura comprende sustitución en posición 71, 73 y/o 78. En algunas
15 modalidades de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una modalidad, estos anticuerpos comprenden secuencias de estructura de dominio variable de cadena pesada de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN[®], Genentech, Inc., Sur de San Francisco, CA, USA) (al que también se hace
20 referencia en las patentes estadounidenses 6,407,213 y 5,821,337 y Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93). En una modalidad, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de consenso de estructura de cadena ligera kI humana. En una modalidad, los anticuerpos comprenden una
25 combinación de IGHV1-46 del subgrupo V1 (número de acceso Gene Bank X92343) y línea germinal IGHJ4 (Número de acceso Gene Bank J00256) mostrados en la figura 12B (secuencia de IGHV1-46). En una modalidad, la secuencia de estructura comprende sustitución en posición 69. En algunas

modalidades, la posición 69 es L. La plantilla humana escogida para la cadena V_L fue una combinación de IGKV4-1 (número de acceso Gene Bank Z00023) y plantilla de línea germinal J IGHJ1 (número de acceso Gene Bank J00242) mostrada en la figura 12A (secuencia de IGKV4-1).

En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada, en donde la secuencia de estructura comprende la secuencia de SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 y/o 48. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera, en donde la secuencia de estructura comprende la secuencia de SEQ ID NO: 49, 50, 51 y/o 52.

En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada, en donde la secuencia de estructura comprende la secuencia de SEQ ID NO: 57, 58, 59 y/o 60. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera, en donde la secuencia de estructura comprende la secuencia de SEQ ID NO: 53, 54, 55 y/o 60.

En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada, en donde la secuencia de estructura comprende la secuencia de SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 y/o 48 y las secuencias de H1, H2 y H3 de HVR son SEQ ID NO: 17, 18 y/o 19, respectivamente. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera, en donde la secuencia de estructura comprende la secuencia de SEQ ID NO: 49, 50, 51

y/ 52 y las secuencias de L1, L2 y L3 de HVR son SEQ ID NO: 12, 13 y/o 16, respectivamente.

En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada, en donde la
5 secuencia de estructura comprende la secuencia de SEQ ID NO: 57, 58, 59 y/o 60 y las secuencias de H1, H2 y H3 de HVR son SEQ ID NO: 17, 18 y/o 19, respectivamente. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera, en donde la secuencia de
10 estructura comprende la secuencia de SEQ ID NO: 53, 54, 55 y/o 56 y las secuencias de L1, L2 y L3 de HVR son SEQ ID NO: 12, 13 y/o 16, respectivamente.

La presente invención incluye un anticuerpo anti-
OX40 que comprende además un marcador detectable. La
15 presente invención incluye además un método para la detección de OX40 in vivo o en una muestra. Tal método comprende poner en contacto el anticuerpo de OX40 con un sujeto o con una muestra obtenida del sujeto.

La presente invención incluye un anticuerpo que
20 comprende además un marcador.

La presente invención incluye los anticuerpos anti-OX40 descritos anteriormente, que comprenden además una citotoxina o inmunotoxina y su uso en el tratamiento de enfermedades o condiciones descritas posteriormente en la
25 presente.

La presente invención también incluye anticuerpos que se enlazan al mismo epítipo como el anticuerpo A10 (TH)hu336F.

La presente invención incluye una molécula de

2X

ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleotidos que codifica un anticuerpo de la presente invención.

La presente invención incluye un vector que
5 comprende la molécula de ácido nucleico de la presente invención.

La presente invención incluye una célula huésped que comprende el vector de la presente invención.

La presente invención incluye un hibridoma que
10 produce un anticuerpo de la presente invención.

La presente invención incluye una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo de la presente invención, en donde la secuencia de nucleotidos comprende cualquiera de SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23 o 24.

15 La presente invención incluye una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo de la presente invención que la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19.

La presente invención incluye una molécula de
20 ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada (VH) resumida en cualquiera de SEQ ID NO: 10, 11, 17, 18 o 19 o codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 25, 26 o
25 27 y/o una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera (VL) resumida en cualquiera de SEQ ID NO: 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15 o 16 o codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23 o 24.

La presente invención incluye una composición que

comprende los anticuerpos de acuerdo con la invención reivindicada en combinación con un portador, diluyente, excipiente aceptable fisiológicamente o estabilizador.

La presente invención incluye un método para la
5 producción de anticuerpos de la invención reivindicada, que comprende cultivar la célula de la presente invención bajo condiciones apropiadas para la producción del anticuerpo y aislamiento del anticuerpo.

Otro aspecto de la presente invención es el uso
10 de anticuerpos antagonistas anti-OX40 en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

La presente invención incluye un método para la prevención de una alteración al inhibir la producción de anticuerpo IgE en un paciente, que comprende administrar al
15 paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo de acuerdo con la presente invención. La alteración incluye, pero no está limitada a asma (tal como asma alérgica), rinitis alérgica, dermatitis atópica, rechazo de trasplante y aterosclerosis.

La presente invención incluye un método para
20 inhibir la producción de anticuerpo de IgE en un paciente, que comprende administrar al paciente un anticuerpo anti-OX40 antagonista de acuerdo con la invención reivindicada. La inhibición de producción de anticuerpo IgE puede impedir
25 asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis alérgica, anafilaxis, urticaria y dermatitis atópica.

La presente invención incluye un método para el tratamiento de una alteración moderada por OX-40 en un paciente, que comprende administrar al paciente una

cantidad efectiva de un anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno de la invención reivindicada, en donde el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del mismo bloquea el enlace de OX40L a OX40 y/o inhibe una o más
5 funciones asociadas con el enlace de OX40L a OX40.

La presente invención incluye un método para el tratamiento de un sujeto que sufre de síntomas asmáticos, que comprende administrar al sujeto, por ejemplo un sujeto en necesidad del mismo, una cantidad de un anticuerpo de
10 acuerdo con la invención reivindicada, efectiva para reducir los síntomas asmáticos.

El anticuerpo de la presente invención puede ser administrado mediante una o más de las rutas en las que se incluyen ruta intravenosa, intraperitoneal, inhalación,
15 intramuscular, subcutánea y oral. La presente invención incluye un dispositivo de inhalación que administra a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de acuerdo con la invención reivindicada.

La presente invención incluye un método para
20 reducir la severidad de asma en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-OX40 que tiene por lo menos una de las siguientes características: la habilidad para enlazarse a OX40 humano con una K_D de entre aproximadamente
25 1×10^{10} a aproximadamente 1×10^{12} M; la habilidad para inhibir una o más funciones asociadas con el enlace del receptor de OX40 e inhibir el enlace de OX40L a dicho receptor.

En ciertas modalidades, el anticuerpo se enlaza a

3

OX40 humano con una constante de disociación de entre aproximadamente 1×10^{-12} M a aproximadamente 1×10^{-11} M, 1×10^{-11} M a aproximadamente 1×10^{-10} M, 1×10^{-10} a aproximadamente 1×10^{-9} M, 1×10^{-9} M a aproximadamente 1×10^{-8} M, 1×10^{-8} M a aproximadamente 1×10^{-7} M.

La presente invención incluye un método para reducir la severidad de asma en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad efectiva de un anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende por lo menos una de las siguientes propiedades: (a) se enlaza a OX40 humano con una K_D de entre aproximadamente 1×10^{-12} M a aproximadamente 1×10^{-8} M; (b) inhibe una o más funciones asociadas con el enlace de OX40 y (c) inhibe el enlace de OX40L a OX40.

Los anticuerpos de la presente invención pueden también ser útiles para el tratamiento de, pero no limitados a, alergia, asma, dermatitis atópica, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de intestino inflamatorio, enfermedad de injerto contra huésped, encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), neuropatías autoinmunes (tales como de Guillain-Barré), ureitis autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune, miastenia gravis, artritis colágeno-inducida, colitis (tal como colitis ulcerativa), reacciones de hipersensibilidad al contacto, diabetes, enfermedad de Crohn y enfermedad de Grave.

Los anticuerpos de la presente invención pueden también ser útiles para el tratamiento de sarcoidosis, leishmaniasis experimental, anemia perniciosa, arteritis

3

temporal, síndrome anti-fosfolípido, vasculitis (tales como granulomatosis de Wegener), enfermedad de Behcet, dermatitis herpetiformis, pénfigo vulgaris, vitiligo, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune, tiroiditis de Hashimoto, ooforitis y orquitis autoinmunes, enfermedad autoinmune de la glándula adrenal, lupus eritematoso sistémico, escleroderma, dermatomiositis, polimiositis, dermatomiositis, espondiloartropatías (tales como espondilitis anquilosante), síndrome de Reiter, síndrome de Sjogren y otros.

La presente invención incluye el uso de un anticuerpo de la presente invención en la preparación de un medicamento.

La presente invención incluye el uso del anticuerpo de la presente invención para el tratamiento de una enfermedad o alteración relacionada con OX40.

La presente invención incluye el uso del anticuerpo de la presente invención para detectar OX40.

La presente invención incluye un kit que comprende el anticuerpo de la presente invención en una cantidad determinada en un recipiente y una solución reguladora del pH en un recipiente separado.

La presente invención incluye un kit que comprende la composición de la presente invención en una cantidad determinada en un recipiente y una solución reguladora del pH en un recipiente separado.

La presente invención incluye un dispositivo médico que comprende el anticuerpo de la presente invención.

La presente invención incluye un dispositivo médico que comprende la composición de la presente invención.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1A ilustra la secuencia de ácidos nucleicos para el cADN de OX40 humano (Número de Acceso NM_004295).

La Figura 1B ilustra la secuencia de aminoácidos para la proteína OX40 humana (Número de Acceso NM_003318).

La Figura 2 ilustra el efecto inhibidor del mAb anti-OX40 de ratón B66 sobre la producción de IL-2 (2A) e IL-13 (2B) mediante células T CD4+ humanas naturales activadas in vitro.

La Figura 3 ilustra el efecto inhibidor de mAb anti-OX40 de ratón B66 sobre la proliferación de células T CD4+ humanas naturales activadas in vitro.

La Figura 4 ilustra el efecto apoptótico de mAb anti-OX40 quiméricos A10 y B66 sobre células Th2 humanas cebadas in vitro.

La Figura 5 ilustra el efecto inhibidor de mAb anti-OX40 quiméricos A10 y B66 sobre la proliferación de células Th2 humanas cebadas in vitro. Los Cuadros Abiertos representan CD4 naturales; el Triángulo Abierto represente CD4+ natural con células L de control; los Triángulos Sólidos representan B66 con CD4+ natural y células L OX40L; los Cuadros Sólidos representan 2C4 (IC) con CD4+ natural y células L OX40L y los Círculos Sólidos representan A10 con CD4+ natural y células L OX40L.

La Figura 6 ilustra el efecto inhibidor de mAb anti-OX40 quiméricos A10 y B66 sobre la producción de IL2 (6A) e IL-13 (6B) mediante células Th2 humanas cebadas in vitro. Los Cuadros Abiertos representan CD4 natural; los Triángulos Abiertos representan CD4+ naturales con células L de control; los Triángulos Sólidos representan B66 con CD4+ natural y células L OX40L; los Cuadros Sólidos representan 2C4 (IC) con CD4+ natural y células L OX40L y los Círculos Sólidos representan A10 con CD4+ natural y células L OX40L.

Figura 7: Tabla que muestra la comparación del efecto inhibidor del mAb anti-OX40 quimérico B66 y el mAb anti-OX40 comercial L106 sobre la producción de IL-2 e IL-13 mediante células T CD4+ humanas naturales activadas in vitro.

Figura 8: Tabla que muestra el efecto inhibidor mAb anti-OX40 humanizado, quimérico y de ratón A10 sobre la proliferación de células T CD4+ humanas naturales activadas in vitro, también como su producción de IL-2, IL-5 e IL-13.

Figura 9: Tabla que muestra el efecto inhibidor mAb anti-OX40 humanizado, quimérico y de ratón A10 sobre la proliferación de células Th1 humanas cebadas in vitro, también como su producción de IL-2, IL-5 e IL-13.

Figura 10: Tabla que muestra el efecto inhibidor mAb anti-OX40 humanizado, quimérico y de ratón A10 sobre la proliferación de células Th2 humanas cebadas in vitro, también como su producción de IL-2, IL-5 e IL-13.

Figura 11: Tabla que muestra el efecto inhibidor mAb anti-OX40 humanizado, quimérico y de ratón A10 sobre la

proliferación de células Th2 humanas cebadas in vitro, también como su producción de IL-2, IL-5 e IL-13 utilizando células dendríticas mieloides activadas por TSLP alogénicas.

5 La Figura 12A ilustra la secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable para anticuerpos murinos A10 y B66, en comparación con la plantilla humana IGKV4-1/IGKJ1 y la secuencia humanizada resultante de A10(TH)hu336F. Los números en subíndices indican posiciones de aminoácidos de
10 acuerdo con Kabat.

 La Figura 12B ilustra la secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable para el anticuerpo murino A10 en comparación con la plantilla humana IGHV1-46/IGHJ4 y la secuencia humanizada resultante de A10(TH)hu336F. Los
15 números en subíndices indican posiciones de aminoácidos de acuerdo con Kabat.

 La Figura 13 ilustra la actividad de enlace superior del clon humanizado A10(TH)hu336F(■) en comparación con el anticuerpo murino padre A10(●) y su
20 forma quimérica (▲).

 La Figura 14 ilustra las secuencias de ácidos nucleicos de las regiones variables murinas y humanizadas de anti-OX40: A) 252-A10 variable kappa de cadena ligera; B) 252-B66 variable kappa de cadena ligera; C) A10(SN) variable de cadena ligera humanizada, anticuerpo entero B y
25 E; D) A10(SH) variable de cadena ligera humanizada; anticuerpo entero A y D; E) A10(TH)hu336 variable de cadena ligera humanizada; anticuerpo entero C y F; F) 252-A10 variable de cadena pesada; G) A10(TH)hu336 variable de

37

cadena pesada, anticuerpos enteros D-F; H) A10 L70 variable de cadena pesada, anticuerpo entero A-C.

La Figura 15 muestra que el clon humanizado A10(TH)hu336F (■), murino A10(●) y su forma quimérica (▲) compiten igualmente bien por OX40.

Las Figuras 16A, B y 17A, B ilustran secuencias de estructura de consenso humanas aceptadas ejemplares para uso en algunas prácticas de la presente invención con identificadores de secuencia como sigue:

10 CDR de Kabat menos estructura de consenso del subgrupo I de VH humano estructuras de consenso de cadena pesada variable (VH) (FIG. 16A,B) (SEQ ID NO:30; regiones hipervariables extendidas menos de estructura de consenso de subgrupo I de VH humana (SEQ ID NO:31-33); CDR de Kabat
15 menos estructura de consenso de subgrupo II de VH humano (SEQ ID NO:34); regiones hipervariables extendidas menos de estructura de consenso de subgrupo II de VH humanas (SEQ ID NO:35-37); CDR de Kabat menos estructura de consenso de subgrupo III de VH humano extendida menos estructura de
20 consenso de subgrupo II de VH humano (SEQ ID NO:38); regiones hipervariables extendidas menos estructura de consenso de subgrupo III de VH humanas (SEQ ID NO:39-41); CDR de Kabat menos estructura de aceptor de VH humana (SEQ ID NO:42); regiones hipervariables extendidas menos
25 estructura aceptora de VH humana (SEQ ID NO:43-44); CDR de Kabat menos estructura de aceptor 2 de VH humana (SEQ ID NO:45); regiones hipervariables extendidas menos estructura de aceptor 2 de VH humana (SEQ ID NO:46-48); estructuras de consenso ligera variable (VL) (FIGURAS 17A,B); estructura

de consenso de subgrupo I kappa VL humana (SEQ ID NO:49);
estructura de consenso de subgrupo II kappa VL humano (SEQ
ID NO:50); estructura de consenso de subgrupo III kappa VL
humano (SEQ ID NO:51); estructura de consenso de subgrupo
5 IV kappa VL humano (SEQ ID NO:52).

La Figura 18 ilustra secuencias de región de
estructura de cadenas ligeras y pesadas de huMAb4D5-8. Los
números en superíndices/negritas indican posiciones de
aminoácidos de acuerdo con Kabat.

10 La Figura 19 ilustra secuencias de región de
estructura modificada/variable de cadenas ligeras y pesadas
de huMAb4D5-8. Los números en superíndices/negritas indican
las posiciones de aminoácidos de acuerdo con Kabat.

15 **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

La presente invención no está limitada a la
metodología, protocolos, líneas celulares, vectores o
reactivos particulares descritos en la presente debido a
que pueden variar. Además, la terminología utilizada en la
20 presente es por el propósito de describir modalidades
particulares solamente y no pretende limitar el alcance de
la presente invención. Como se usan en la presente y en las
reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un",
"uno" y "el" incluyen referencias plurales, a no ser que el
25 contexto lo determine claramente de otra manera, por
ejemplo, la referencia a "una célula huésped" incluye una
pluralidad de tales células huésped. A no ser que se
definan de otra manera, todos los términos técnicos y
científicos y cualesquier siglas utilizados en la presente

32

tienen los mismos significados como se entienden comúnmente por aquel de habilidad en el arte en el campo de la invención. Aunque cualesquier métodos y materiales similares o equivalentes a aquéllos descritos en la presente pueden ser usados en la práctica de la presente invención, se describen en la presente los métodos, dispositivos y materiales ejemplares.

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la presente son mencionadas por referencia a la extensión permitida por la ley por el propósito de describir y regular las proteínas, enzimas, vectores, células huésped y metodologías reportadas en la presente que podrían ser usados con la presente invención. Sin embargo, nada en la presente se interpretará como admisión de que la invención no tiene derecho a anticiparse a tal revelación en virtud de invenciones previas.

DEFINICIONES

Los términos utilizados en toda esta solicitud serán interpretados con el significado ordinario y representativo para aquéllos de habilidad ordinaria en el arte. Sin embargo, la solicitante desea que se les dé a los siguientes términos la definición particular como se describe posteriormente en la presente.

La frase "sustancialmente idéntico" con respecto a una secuencia de polipéptidos de cadena de anticuerpo puede ser interpretada como una cadena de anticuerpos que exhibe por lo menos 70% u 80% o 90% o 95% de identidad de secuencia con la secuencia de polipéptidos de referencia.

22

El término con respecto a una secuencia de ácidos nucleicos puede ser interpretado como una secuencia de nucleótidos que exhiben por lo menos aproximadamente 85% o 90% o 95% o 97% de identidad de secuencia con la secuencia de ácidos nucleicos de referencia.

El término "identidad" u "homología" serán interpretados para dar a entender el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos con el residuo de una secuencia correspondiente con la cual es comparada, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para obtener el porcentaje de identidad máximo para toda la secuencia y no considerando cualesquier sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. Ni extensiones N- o C-similares, ni inserciones serán interpretadas para reducir la identidad u homología. Métodos y programas de computadora para la alineación son bien conocidos en el arte. La identidad de secuencia puede ser medida utilizando elementos de programación y análisis de secuencias.

El término "anticuerpo" es usado en el sentido más amplio, en los que se incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, esto es, moléculas que contienen un sitio de enlace de antígeno que se enlaza inmuno-específicamente a un antígeno y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (en los que se incluyen anticuerpos monoclonales de plena longitud) anticuerpos policlonales y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos bispecíficos). Los anticuerpos (Abs) e

39

inmunoglobulinas (Igs) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos exhiben especificidad de enlace a un objetivo específico, las inmunoglobulinas incluyen ambos anticuerpos y otras moléculas semejantes a anticuerpos que carecen de especificidad de objetivo. Los anticuerpos naturales e inmunoglobulinas son usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150,000 daltons, que consisten de dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo. Además, el término "anticuerpo" (Ab) o "anticuerpo monoclonal" (mAb) se propone incluir tanto moléculas intactas, también como fragmentos de anticuerpo (tales como, por ejemplo, Fab y $F(ab')_2$) que son aptos de enlazarse específicamente a una proteína. Los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ carecen del fragmento de Fc de anticuerpo intacto, se despejan más rápidamente de la circulación del animal o planta y pueden tener menos enlace de tejido no específico que un anticuerpo intacto (Wahl, et al., *J Nucl Med* 24:316(1983)).

Como se usa en la presente, "anticuerpo anti-OX40" significa un anticuerpo que se enlaza a OX40 humano de tal manera para inhibir o reducir sustancialmente el enlace de tal OX40 a su ligando, ligando de OX40.

Como se usa en la presente, el término "alteración moderada por OX40" incluye condiciones

SO

asociadas con alergia, asma y enfermedades asociadas con autoinmunidad e inflamación, que incluyen esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de intestino inflamatorio, enfermedad de injerto contra huésped, 5 encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), leishmaniasis experimental, artritis colágeno-inducida, colitis (tal como colitis ulcerativa), reacciones de hipersensibilidad al contacto, diabetes, enfermedad de Crohn y enfermedad de Grave. Otras condiciones tales como 10 sarcoidosis, enfermedades oculares autoinmunes, uveitis autoinmune, dermatitis atópica, miastenia grave, neuropatías autoinmunes (tal como Guillain-Barré), ureitis autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, anemia perniciosa, trombocitopenia autoinmune, arteritis temporal, 15 síndrome anti-fosfolípido, vasculitis (tal como granulomatosis de Wegener), enfermedad de Behcet, soriasis, dermatitis herpetiforme, pénfigo vulgaris, vitiligo, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune, tiroiditis de Hashimoto, oforitis autoinmune y orquitis, enfermedad 20 autoinmune de la glándula adrenal, lupus eritematoso sistémico, escleroderma, dermatomiositis, polimiositis, dermatomiositis, espondiloartropatías (tal como espondilitis anquilosante), Síndrome de Reiter y Síndrome de Sjogren son también abarcados bajo el alcance de este 25 término.

El término "variable" en el contexto de dominio variable de anticuerpo, se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre anticuerpos y son usadas en el enlace y

especificidad de cada anticuerpo particular por su objetivo particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida igualmente a través de los dominios variables de anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos llamados

5 regiones que determinan la complementareidad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables tanto en los dominios variables de cadena pesada y cadena ligera. Las porciones más altamente conservadas de dominios variables son llamadas la estructura (FR). Como es conocido en el

10 arte, la posición/frontera de aminoácidos que delinea una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y las varias dimensiones conocidas en el arte. Algunas posiciones dentro de un dominio variable pueden ser observadas como posiciones

15 hipervariables híbridas en que se puede considerar que estas posiciones están dentro de una región hipervariable bajo un conjunto de criterios en tanto que se considera que están fuera de una región hipervariable bajo un conjunto de criterios diferentes. Una o más de estas posiciones pueden

20 también ser encontradas en regiones hipervariables extendidas. La invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en estas posiciones hipervariables híbridas. Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras naturales cada una comprenden cuatro

25 regiones de FR, que adoptan extensamente una configuración de hoja β , unidas mediante tres CDR, que forman bucles que unen y en algunos casos forman parte de la estructura de hoja β . Las CDR en cada cadena son mantenidas conjuntamente en proximidad estrecha con las regiones de FR y con las CDR

de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de enlace objetivo de anticuerpo (véase Kabat, et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1987)). Como se usa en la presente, la numeración de los residuos de aminoácidos de inmunoglobulina se hace de acuerdo con el sistema de numeración de residuos de aminoácidos de inmunoglobulina de Kabat, et al., a no ser que se indique de otra manera.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo de plena longitud, en general la región de enlace objetivo o región variable. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv. La frase "fragmento de enlace de antígeno" de un anticuerpo es un compuesto que tiene actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo de plena longitud. Por ejemplo, un fragmento de enlace de antígeno de un anticuerpo anti-OX40 es uno que se puede enlazar a un receptor de OX40 de tal manera para impedir o reducir sustancialmente la habilidad de tal molécula de tener la habilidad de enlazarse al ligando de OX40. Como se usa en la presente, "fragmento funcional" con respecto a anticuerpos, se refiere a fragmentos de Fv, F(ab) y F(ab')₂. Un fragmento de Fv es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y enlace objetivo completo. Esta región consiste de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y ligera en una fuerte asociación no covalente (dímero V_H-V_L). Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de enlace objetivo sobre

la superficie del dímero de V_H - V_L . Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de enlace de antígeno al anticuerpo. Sin embargo, aún un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente 3 CDR específicas por un objetivo) tiene la habilidad de reconocer y enlazarse al objetivo, aunque a una afinidad más baja que todo el sitio de enlace. Fragmentos de anticuerpo "Fv de una sola cadena" o "sFv" comprenden los dominios de V_H y V_L de una anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptido. En general, el polipéptido de Fv comprende además un enlazador de polipéptido entre los dominios de V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para el enlace objetivo.

El fragmento de Fab contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el término carboxilo del dominio de CH1 de cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región de engozne de anticuerpos. Los fragmentos de F(ab') son producidos mediante escisión del enlace de disulfuro en las cisteínas de engozne del producto de digestión de pepsina de F(ab')₂, acoplamiento químicos adicionales de fragmentos de anticuerpo son conocidos para aquéllos de habilidad ordinaria en el arte.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, esto es, los anticuerpos individuales que comprenden la

población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se presentan de manera estable en la naturaleza que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos

5 contra un solo sitio objetivo. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpo (policlonales) convencionales que incluyen comúnmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un solo determinante sobre

10 el objetivo. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que pueden ser sintetizados a partir del cultivo de hibridoma, sin contaminar por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo por ser obtenido de una población

15 sustancialmente homogénea de anticuerpos y no se interpretará que requiere la producción del anticuerpo mediante algún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para uso con la presente invención pueden ser aislados a partir de bibliotecas de fago

20 utilizando las técnicas bien conocidas. Los anticuerpos monoclonales padres a ser usados de acuerdo con la presente invención pueden ser elaborados mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler, et al., Nature 256:495 (1975) o pueden ser elaborados mediante

25 métodos recombinantes.

El término anticuerpo "quimérico" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo que tiene secuencias variables derivadas de inmunoglobulinas no humanas, tal como un anticuerpo de rata o ratón y regiones constantes de

inmunoglobulina humana, escogidas comúnmente de una plantilla de inmunoglobulina humana.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murino) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras secuencias de enlace objetivo de anticuerpos) que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno y comúnmente dos dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones de CDR corresponden a aquéllas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son aquéllas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede también comprender por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), comúnmente aquélla de una plantilla de inmunoglobulina humana escogida.

Como se usa en la presente, "anticuerpos humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe *infra* por ejemplo en la Patente Estadounidense 5,939,598 por Kucherlapati, et al.

Los términos "célula", "línea celular" y "cultivo celular" incluyen progenie. También se comprenderá que

todas las progenies pueden no ser precisamente idénticas en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. La progenie variante que tiene la misma función o propiedad biológica, tal como es seleccionada en la célula transformada originalmente están incluidas. Las "células huésped" usadas en la presente invención son en general huéspedes procarióticos o eucarióticos.

"Transformación" de un organismo celular con ADN significa introducir ADN a un organismo de tal manera que el ADN es replicable, ya sea como un elemento extra cromosomal o mediante integración cromosomal. "Transfección" de un organismo celular con ADN se refiere a la absorción de ADN, por ejemplo, un vector de expresión, por la célula u organismo ya sea que las secuencias de codificación sean en efecto expresadas o no. Los términos "célula huésped transfectada" y "transformada" se refieren a una célula en la cual se introdujo ADN. La célula es denominada "célula huésped" y puede ser ya sea procariótica o eucariótica. Las células procarióticas típicas incluyen varias cepas de E.coli. Las células huésped eucarióticas típicas son mamíferas, tales como células de ovario de hámster chino o células de origen humano. La secuencia de ADN introducida puede ser de la misma especie como la célula huésped o de una especie diferente de la célula huésped o puede ser una secuencia de ADN híbrida, que contiene algo de ADN extraño y algo de ADN homólogo.

El término "vector" significa un constructo de ADN que contiene una secuencia de ADN que es enlazada

operativamente a una secuencia de control apropiada apta de efectuar la expresión del ADN en un huésped apropiado. Tales secuencias de control incluyen un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia de operador
5 opcional para controlar tal transcripción, una secuencia que codifica sitios de enlace de ribosoma de mRNA apropiados y secuencias que controlan la terminación de transcripción y traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula de fago o simplemente un inserto
10 genómico potencial. Una vez transformado a un huésped apropiado, el vector se puede replicar y funcionar independientemente del genoma huésped o puede en algunas instancias integrarse al genoma mismo. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" son algunas veces
15 usados intercambiablemente, ya que el plásmido es la forma más usada comúnmente de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vector que sirven para funciones equivalentes y que son o se harán conocidos en el arte.

20 "Mamífero" por propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, en los que se incluyen humanos, animales domésticos y de granja, primates no humanos y animales de zoológico, deportivos o de mascota, tales como perros, caballos,
25 gatos, vacas, etc.

La palabra "marcador" cuando se usa en la presente se refiere a un compuesto o composición detectable que puede ser conjugado directa o indirectamente a una molécula o proteína, por ejemplo un anticuerpo. El marcador

puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o en el caso de un marcador enzimático, pueden catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es
5 detectable.

Como se usa en la presente, "fase sólida" significa una matriz no acuosa a la cual el anticuerpo de la presente invención se puede adherir. Ejemplos de fases sólidas abarcadas en la presente incluyen aquéllas formadas
10 parcial o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacárido (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas modalidades, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender la cavidad de una
15 placa de análisis; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad).

INMUNÓGENO

Dos formas del receptor de OX40 fueron usadas
20 como inmunógeno para generar anticuerpos anti-OX40 de la presente invención: (1) uno fue la forma soluble del receptor OX40 humano expresado como proteína de fusión que comprende un Fcγ1 humano y el dominio extracelular codificado por residuos de nucleótidos 105 a 627 y (2) el
25 segundo fue un inmunógeno a base de célula que comprende el OX40 de plena longitud expresado sobre la superficie de células L de fibroblasto de ratón transfectadas establemente. Receptor de OX40 soluble o fragmentos del mismo pueden ser usados como inmunógenos para generar los



anticuerpos de la invención. Los anticuerpos antagonistas resultantes son dirigidos contra OX40 y aptos de impedir que OX40L interactúe con OX40, neutralizando mediante esto la actividad del receptor. Preferiblemente, el inmunógeno es un polipéptido y puede ser una molécula de transmembrana. El inmunógeno puede ser producido recombinantemente o elaborado utilizando métodos sintéticos. El inmunógeno puede también ser aislado de una fuente natural.

El inmunógeno puede comprender el dominio extracelular de OX40. Alternativamente, células que expresan una proteína de transmembrana que comprende el dominio extracelular pueden ser usadas como el inmunógeno. Tales células pueden ser derivadas de una fuente natural (por ejemplo, líneas de células T) o pueden ser células que han sido transformadas mediante técnicas recombinantes para expresar el receptor sobre su superficie. Otros inmunógenos y formas de los mismos útiles para generar anticuerpos serán evidentes para aquéllos experimentados en el arte. La inmunización de un animal huésped, tal como un roedor, con un inmunógeno de célula entera es bien conocida en el arte.

Alternativamente, un gen o un cADN que codifica OX40 puede ser clonado a un plásmido u otro vector de expresión y expresado en cualquiera de una diversidad de sistemas de expresión de acuerdo con métodos bien conocidos para aquéllos experimentados en el arte. Métodos de clonación y expresión de OX40 y la secuencia de ácidos nucleicos para OX40 son bien conocidos (véase, por ejemplo, Patente Estadounidense 5,821,332 y 5,759,546). Debido a la



degeneración del código genético, se pueden producir una multitud de secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de OX40. Se puede hacer variar la secuencia de nucleótidos al seleccionar combinaciones en base a posibles
5 elecciones de codón. Estas combinaciones se hacen de acuerdo con el código genético de triplete estándar tal como es aplicado a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido OX40 que se presenta de manera estable en la naturaleza y todas de tales variaciones serán consideradas.
10 Cualquiera de estos polipéptidos pueden ser usados en la inmunización de un animal para generar anticuerpos que se enlazan a OX40.

El polipéptido de OX40 inmunógeno puede ser expresado, cuando es benéfico, como una proteína de fusión
15 que tiene el polipéptido de OX40 fusionado a otro polipéptido, tal como una región de Fc de inmunoglobulinas. El polipéptido fusionado ayuda frecuentemente en la presentación de proteína, por ejemplo, al permitir que la proteína de fusión sea aislada y purificada mediante
20 cromatografía de afinidad. Proteínas de fusión pueden ser producidas al cultivar una célula recombinante transformada con una secuencia de ácidos nucleicos de fusión que codifica una proteína que incluye el segmento de fusión anexado ya sea al extremo carboxilo y/o amino terminal de
25 la proteína. Segmentos de fusión pueden incluir pero no están limitados a, regiones de Fc de inmunoglobulina, glutathione-S-transferasa, β -galactosidasa, un segmento de poli-histidina apto de enlazarse a un ion de metal divalente y proteína de enlace de maltosa.

07

En la presente invención, OX40 recombinante fue usado para inmunizar ratones para generar los anticuerpos antagonistas. OX40 recombinante está disponible comercialmente de una diversidad de fuentes (véase, por ejemplo R&D Systems, Minneapolis, M.N., PeproTech, Inc., NJ, and Sanofi Bio-Industries, Inc., Tervose, PA.) Polipéptidos ejemplares comprenden todas o una porción de SEQ ID NO:1 y variantes de las mismas.

10

GENERACIÓN DE ANTICUERPOS

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser generados mediante cualquier método apropiado conocido en el arte. Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender anticuerpos policlonales. Métodos para la preparación de anticuerpos policlonales son conocidos para aquél de habilidad en el arte (Harlow, et al., Antibodies: a Laboratory Manual, Cold spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988), que es incorporada a la presente por referencia en su totalidad.

20

Por ejemplo, un inmunógeno como se describe anteriormente puede ser administrado a varios animales huésped, en los que se incluyen pero no limitados a, conejos, ratones, ratas, etc., para inducir la producción de suero que contiene anticuerpos policlonales específicos para el antígeno. La administración del inmunógeno puede abarcar una o más inyecciones de una agente inmunizante y si se desea un adyuvante. Varios adyuvantes pueden ser usados para incrementar la respuestas inmunológica, dependiendo de la especie huésped e incluyen pero no están

25

limitados a, medio de Freund (completo e incompleto) sales minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas superficiales tales como lisolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lata de bucardado, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (Bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Ejemplos adicionales de adyuvantes que pueden ser empleados incluyen el adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de triacosa sintética). Los protocolos de inmunización son bien conocidos en el arte y pueden ser efectuados mediante cualquier método que produzca una respuesta inmune en el animal huésped escogido. Adyuvantes son también bien conocidos en el arte.

Comúnmente, el inmunógeno (con o sin adyuvante) es inyectado al animal mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales o intramuscularmente o por medio IV. El inmunógeno puede incluir un polipéptido de OX40, una proteína de fusión o variantes de los mismos. Dependiendo de la naturaleza de los polipéptidos (esto es, por ciento de hidrofobicidad, por ciento de hidrofiliidad, estabilidad, carga neta, punto isoeléctrico, etc.), puede ser útil conjugar el inmunógeno a una proteína que se sabe que es inmunógena en el mamífero que es inmunizado. Tal conjugación incluye ya sea conjugación química mediante derivación activa de grupos funcionales químicos tanto al inmunógeno como la proteína inmunogénica a ser conjugada, de tal manera que se forma un enlace covalente o por medio de metodología basada en proteína de fusión u otros métodos

conocidos por aquéllos de habilidad en el arte. Ejemplos de tales proteínas inmunógenas incluyen pero no están limitadas a hemocianina de lapa de bocallave, ovalbúmina, suero de albúmina, tiroglobulina bovina, inhibidor de tripsina de soya y péptidos auxiliares T promiscuos. Varios adyuvantes pueden ser usados para incrementar la respuesta inmunológica como se describe anteriormente.

Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos que reconocen un solo sitio antigénico. Su especificidad uniforme hace a los anticuerpos monoclonales mucho más útiles que los anticuerpos policlonales, que contienen usualmente anticuerpos que reconocen una variedad de diferentes sitios antigénicos. Los anticuerpos monoclonales pueden ser preparados al utilizar la tecnología de hibridoma, tal como aquella descrita por Kohler, et al., *Nature* 256:495(1975); Patente Estadounidense 4,376,110; Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988) y Hammerling, et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, Elsevier (1981), métodos de AND recombinantes u otros métodos conocidos para aquél de habilidad ordinaria en el arte. Otros ejemplos de métodos que pueden ser empleados para producir anticuerpos monoclonales incluyen pero no están limitados a la técnica de hibridoma de célula B humana (Kosbor, et al., *Immunology Today* 4:72 (1983); Cole, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2026 (1983)) y la técnica de EBV-hibridoma (Cole, et al., *Monoclonal Antibodies and*

JP

Cancer Teraphy, p.p. 77-96, Alan R. Liss (1985)). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina en las que se incluyen IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualesquier subclases de las mismas. El hibridoma que produce el mAb de esta invención puede ser cultivado *in vitro* o *in vivo*.

En el modelo de hibridoma, un huésped tal como un ratón, un ratón humanizado, un ratón con un sistema inmune humano, hámster, conejo, camello o cualquier otro animal huésped apropiado, es inmunizado para producir linfocitos que producen o son aptos de producir anticuerpos que se enlazarán específicamente a la proteína usada para inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. Luego los linfocitos son fusionados con células de mieloma utilizando un agente de fusión apropiado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, p.p. 59-103 (1986)).

En general, en la elaboración de hibridomas que producen anticuerpos, se usan ya sea linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano o se usan células de vaso o células de nodo linfático si se desean fuentes mamíferas no humanas. Luego los linfocitos son fusionados con una línea celular immortalizada utilizando un agente de fusión apropiada, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, p.p. 59-103 (1986)). Líneas celulares

inmortalizadas son usualmente células mamíferas transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino o humano. Comúnmente, se usa una línea celular de mieloma de rata o ratón. Las células de
5 hibridoma pueden ser cultivadas en un medio de cultivo apropiado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células inmortalizadas sin fusionar. Por ejemplo, si las células padre carecen de la enzima hipoxantina guanina
10 fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá comúnmente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio de HAT"), sustancias que impiden el crecimiento de células HGPRT - deficientes.

15 Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquéllas que se fusionan eficientemente, soportan la producción de alto nivel estable de anticuerpo por las células que producen anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio de HAT. Entre estas
20 líneas celulares de mieloma se encuentran líneas de mieloma murina, tales como aquéllas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. Solicitud de Patente Estadounidense y SP2/0 o células X63-Ag8-653 disponibles de
25 la American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA. Líneas celulares de heteromieloma de ratón-humano y de mieloma humano también han sido descritas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J Immunol 133:3001 (1984); Brodeur, et al., Monoclonal

JZ

Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc. p.p. 51-63 (1987)). La línea celular de mieloma de ratón NSO puede también ser usada (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wilshire, UK).

5 El medio de cultivo en el cual las células de hibridoma son cultivadas es analizado en cuanto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la OX40. La especificidad de enlace de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma puede
10 ser determinada mediante inmunoprecipitación o mediante un análisis de enlace *in vitro*, tales como radioinmunoanálisis (RIA) o análisis inmunoabsorbente enzima-enlazada (ELISA). Tales técnicas son conocidas en el arte y están dentro de la habilidad de aquéllos experimentados en el arte. La
15 afinidad de enlace del anticuerpo monoclonal a OX40 puede ser determinada por ejemplo, mediante un análisis de Scatchard (Munson, et al., Anal Biochem (107:220 (1980))).

Después que las células de hibridoma son identificadas que producen anticuerpos de la especificidad,
20 afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden ser subclonados mediante procedimientos de dilución limitante y cultivados mediante métodos estándar ((Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, p.p. 59-103 (1986))). Medios de cultivo apropiados para este
25 propósito incluyen, por ejemplo medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) o medio de RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden ser cultivadas *in vivo* como tumores de ascites en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los

✓7

subclones son separados o aislados apropiadamente del medio de cultivo, fluido de ascitis o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tal como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, 5 cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de exclusión de gel, electroforesis de gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Existen una variedad de métodos en el arte para la producción de anticuerpos monoclonales y así, la 10 invención no está limitada a su sola producción en hibridomas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden ser elaborados mediante métodos de ADN recombinantes, tales como aquellos descritos en la patente estadounidense No. 4,816,567. Las células de hibridoma 15 sirven como fuente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede ser colocado a vectores de expresión, que son luego transfectados a células huésped tales como células de E. coli, células NSO, células COS simias, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de 20 otra manera proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también puede ser modificado, por ejemplo, al sustituir la secuencia de codificación para dominios constantes de cadena pesada y ligera humanas en 25 lugar de las secuencias murinas homólogas (patente estadounidense No. 4,816,567; Morrison, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6851 (1984)) o al unir covalentemente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina todo o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido sin

7

inmunoglobulina. Tal polipéptido sin inmunoglobulina puede ser sustituido por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención o puede ser sustituido para los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Métodos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en el arte. Por ejemplo, un método involucra la expresión recombinante de cadena ligera de inmunoglobulina y cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada es truncada en general en cualquier punto en la región Fc para impedir la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes son sustituidos con otro residuo de aminoácido o son cancelados para impedir la reticulación.

Fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopos específicos pueden ser generados mediante técnicas conocidas. Tradicionalmente, estos fragmentos eran derivados vía digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto, et al., *J Biochem Biophys Methods* 24:107 (1992); Brennan, et al., *Science* 229:81 (1985)). Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención pueden ser producidos mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos de Fab) o pepsina (para producir fragmentos de F(ab')₂). Los fragmentos de F(ab')₂ contienen la región variable, la

región constante de cadena ligera y el dominio de CH1 de la cadena pesada. Sin embargo, estos fragmentos pueden ahora ser producidos directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden ser aislados de una biblioteca de fago de anticuerpo. Alternativamente, los fragmentos $F(ab')_2$ -SH pueden ser recuperados directamente de *E. coli* y acoplados químicamente para formar fragmentos de $F(ab')_2$ (Carter, et al., *Bio/Technology* 10:163 (1992)). De acuerdo con otro procedimiento, los fragmentos de $F(ab')_2$ pueden ser aislados directamente del cultivo de célula huésped recombinante. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el técnico experimentado. En otras modalidades, la elección de anticuerpo es un fragmento de Fv de una sola cadena (solicitud de patente PCT WO 93/16185).

Para algunos usos, en los que se incluyen uso in vivo de anticuerpos en humanos y análisis de detección in vitro, puede ser preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual diferentes porciones del anticuerpo son derivadas de diferentes especies de animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en el arte. Véase por ejemplo, Morrison, *Science* 229: 1202 (1985); Oi, et al., *BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies, et al., *J Immunol Methods* 125:191 (1989); patentes estadounidenses Nos.

63

5,807,715; 4,816,567; y 4,816397, que son incorporadas en la presente por referencia en su totalidad.

Un anticuerpo humanizado está diseñado para tener mayor homología a una inmunoglobulina humana que los anticuerpos monoclonales derivados de animal. La humanización es una técnica para elaborar un anticuerpo quimérico en donde sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo generadas en una especie no humana que enlaza el antígeno deseado que tiene una o más regiones que determinan la complementareidad (CDR) de la especie no humana y regiones de estructura (FR) de una molécula de inmunoglobulina humana. Frecuentemente, los residuos de estructura en las regiones de estructura humana serán sustituidos con el residuo correspondiente del anticuerpo donador de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, el enlace de antígeno. Estas sustituciones de estructura son identificadas mediante métodos bien conocidos en el arte, por ejemplo, mediante el modelado de las interacciones de la CDR y residuos de estructura para identificar residuos de estructura importantes por el enlace de antígeno y comparación de secuencias para identificar residuos de estructura inusuales en posiciones particulares. Véase, por ejemplo, patente estadounidense No. 5,585,089; Riechmann, et al., *Nature* 332:323 (1988), que son incorporados en la presente por referencia en su totalidad. Los anticuerpos pueden ser humanizados utilizando una variedad de técnicas conocidas en el arte,

en las que se incluyen, por ejemplo, CDR-injertación (EP 239,400; publicación de PCT WO 91/09967; patentes estadounidenses Nos. 5,225,539; 5,530,101; y 5,585,089), revestimiento o recubrimiento (EP 592,106; EP 519,596; 5 Padlan, *Molecular Immunology* 28:489 (1991); Studnicka, et al., *Protein Engineering* 7:805 (1994); Roguska, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 91:969 (1994)) y entremezcla de cadenas (patente estadounidense No. 5,565,332).

En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o 10 más residuos de aminoácido introducidos al mismo de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos son frecuentemente determinados como residuos de "importación", que son tomados comúnmente de un dominio variable de "importación". La humanización puede ser 15 efectuada esencialmente siguiendo los métodos de Winter y colaboradores (Jones, et al., *Nature* 321:522 (1986); Riechmann, et al., *Nature* 332:323 (1988); Verhoeven, et al., *Science* 239:1534 (1988)), al sustituir CDR no humanas o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de 20 un anticuerpo humano. Así, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente estadounidense No. 4,816,567), en donde sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, 25 los anticuerpos humanizados son comúnmente anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR son sustituidos de sitios análogos en anticuerpos roedores.

Es además importante que los anticuerpos

62

humanizados retengan afinidad más alta por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para obtener este objetivo, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados son preparados mediante un proceso

5 de análisis de las secuencias padres y varios productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias padre y humanizadas. Modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles comúnmente y son familiares para aquellos

10 experimentados en el arte. Están disponibles programas de computadora que ilustran y despliegan estructuras conformacionales tridimensionales probable de secuencias de inmunoglobulina candidata seleccionadas. La inspección de estos despliegues permite el análisis del papel probable de

15 ciertos residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, esto es, el análisis de residuos que influencia la habilidad de las secuencias de inmunoglobulina candidatas, esto es, el análisis de residuos que influyen la habilidad de la inmunoglobulina

20 candidata para enlazarse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR pueden ser seleccionados y combinados de las secuencias de receptor y de importación, de tal manera que la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad incrementada por el (los) antígeno(s) objetivo, es

25 maximizada, aunque son los residuos de CDR que influyen directa y más sustancialmente el enlace de antígeno.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a ser usados en la elaboración de anticuerpos humanizados es importante para reducir la

65

antigenicidad. De acuerdo con el llamado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo no humano es seleccionada contra toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La

5 secuencia humana que es más cercana a aquella del anticuerpo padre no humano es luego aceptada como la FR humana para el anticuerpo humanizado (Sims, et al., *J Immunol* 151:2296 (1993); Chothia, et al., *J Mol Biol* 196:901 (1987)).

10 Otro método utiliza una estructura particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma estructura puede ser usada para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter, et al.,

15 *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4285 (1992); Presta, et al., *J Immunol* 151:2623 (1993)). Un anticuerpo de la invención puede comprender cualquier secuencia de estructura de cadena ligera o pesada de consenso humana o humana apropiada, a condición de que el anticuerpo exhiba las

20 características biológicas deseadas (por ejemplo, una afinidad de enlace deseada). En algunas modalidades, una o más (tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más) modificaciones adicionales están presentes dentro de las secuencias de región no hipervariable de consenso humana

25 y/o humana. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende por lo menos una porción (o toda) de la secuencia de estructura de cadena ligera humana. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende por lo menos una porción (o toda) de la secuencia de estructura de cadena

pesada humana. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende por lo menos una porción (o toda) de la secuencia de consenso de estructura de subgrupo I humana. En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención
5 comprenden una secuencia de consenso de estructura de cadena pesada de subgrupo III humana. En una modalidad, la secuencia de consenso de estructura del anticuerpo de la invención comprende sustitución en posición 71, 73 y/o 78. En algunas modalidades de estos anticuerpos, la posición 71
10 es A, 73 es T y/o 78 es A.

Anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Anticuerpos humanos pueden ser elaborados mediante una variedad de métodos conocidos en el
15 arte en los que se incluyen métodos de despliegue de fago descritos anteriormente utilizando bibliotecas de anticuerpo derivadas de secuencias de inmunoglobulina humanas. Véase también, patentes estadounidenses Nos. 4,444,887 y 4,716,111; y publicaciones de PCT WO 98/46645,
20 WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741; cada uno de los cuales es incorporado en la presente por referencia en su totalidad. Las técnicas de Cole, et al. y Boerner, et al. están también disponibles para la preparación de anticuerpos
25 monoclonales humanos (Cole, et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Riss (1985); y Boerner, et al., *J Immunol* 147:86 (1991)).

Anticuerpos humanos pueden también ser producidos utilizando ratones transgénicos que son incapaces de

6j

expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humanos. Por ejemplo, los complejos de gen de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humanos pueden ser introducidos aleatoriamente o mediante recombinación homóloga a células de tallo embriónicas de ratón. Alternativamente, la región variable humana, región constante y región de diversidad pueden ser introducidas a células de tallo embriónicas de ratón además de los genes de cadena pesada y ligera humanos. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón se pueden volver no funcionales separada o simultáneamente con la introducción de sitios de inmunoglobulina humanos mediante recombinación homóloga. En particular, la cancelación homóciga de la región JH impide la producción de anticuerpo endógeno. Las células de tallo embriónicas modificadas con expandidas y microinyectadas a blastocistos para producir ratones quiméricos. Luego los ratones quiméricos son cruzados para producir progenie homóciga que expresa anticuerpos humanos. Véase, por ejemplo, Jakobovitis, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2551 (1993); Jakobovitis, et al., *Nature* 362:255 (1993); Bruggermann, et al., *Year in Immunol* 7:33 (1993); Duchosal, et al., *Nature* 355:258 (1992)).

Los ratones transgénicos son inmunizados de manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de un polipéptido de la invención. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden ser obtenidos de los ratones transgénicos inmunizados utilizando tecnología de hibridoma

66

convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humanos albergados por los ratones transgénicos se re-arreglan durante la diferenciación de célula B y subsecuentemente sufren conmutación de clase y mutación somática. Así, utilizando tal técnica, es posible producir terapéuticamente anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE útiles. Para una vista general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg, et al., *Int Rev Immunol* 13:65-93 (1995). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir tales anticuerpos, véase, por ejemplo, publicaciones de PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; patente Europea No. 0 598 877; patentes estadounidenses Nos. 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 5,885,793; 5,916,771; y 5,939,598, que son incorporadas por referencia en la presente en su totalidad. Además, compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, California), Genpharm (San Jose, California) y Medarex, Inc. (Princeton, NJ.) pueden ser contactadas para proveer anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado utilizando tecnología similar a aquella descrita anteriormente.

También, mAb humanos podrían ser elaborados al inmunizar ratones trasplantados con leucocitos de sangre periférica humanos, esplenocitos o médulas óseas (por ejemplo, técnicas de Trioma de XTL). Anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado pueden ser generados utilizando una técnica denominada como

62

"selección guiada". En este procedimiento, un humano monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, es usado para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers, *et al.*, *Bio/Technology* 12:899 (1988)).

Además, los anticuerpos a los polipéptidos de la invención pueden a su vez ser utilizados para generar anticuerpos anti-idiotipo que "imitan" polipéptidos de la invención utilizando técnicas bien conocidas para aquellos experimentados en el arte (Véase, por ejemplo, Greenspan, *et al.*, *FASEB J* 7:437 (1989); Nissinoff, *J Immunol* 147:2429 (1991)). Por ejemplo, anticuerpos que se enlazan a e inhiben completamente la multimerización de polipéptido y/o enlace de un polipéptido de la invención a un ligando pueden ser usados para generar anti-idiotipos que "imitan" la multimerización de polipéptido y/o dominio de enlace y como consecuencia, se enlazan a y neutralizan el polipéptido y/o su ligando. Tales anti-idiotipos neutralizantes o fragmentos Fab de tales anti-idiotipos pueden ser usados en regímenes terapéuticos para neutralizar el ligando de polipéptido. Por ejemplo, tales anticuerpos anti-idiotípicos pueden ser usados para enlazar un polipéptido de la invención y/o para enlazar sus ligandos/receptores y bloquear mediante esto su actividad biológica.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados que tienen

67

especificidades de enlace por al menos dos antígenos diferentes. En la presente invención, una de las especificidades de enlace pueden ser dirigidas hacia OX40, la otra puede ser para cualquier otro antígeno y
5 preferiblemente, para una proteína de superficie celular, receptor, subunidad de receptor, antígeno tejido-específico, proteína derivada viralmente, proteína de envoltente codificada viralmente, proteína bacterianamente derivada o proteína de superficie bacteriana, etc.

10 Métodos para fabricar anticuerpos biespecíficos son bien conocidos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos está basada en la co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas pesadas tienen
15 especificidades diferentes (Milstein, *et al.*, *Nature* 305:537 (1983)). Debido al surtido aleatorio de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solamente una tiene
20 la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se lleva a cabo usualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. Procedimientos similares son revelados en WO 93/08829 y en Traunecker, *et al.*, *EMBO J* 10:3655 (1991).

25 Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de enlace deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) pueden ser fusionados a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada

de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones de articulación, CH2 y CH3. Puede tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para el enlace de cadena ligera presente en
5 por lo menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, son insertados a vectores de expresión separados y son co-transformados a un organismo huésped apropiado. Para detalles adicionales de
10 la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo Suresh, et al., *Meth in Enzym* 121:210 (1986).

Anticuerpos heteroconjugados son también contemplados por la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos
15 covalentemente. Tales anticuerpos han sido por ejemplo, propuestos para apuntar células del sistema inmune a células indeseables (patente estadounidense No. 4,676,980). Se contempla que los anticuerpos pueden ser preparados in vitro utilizando métodos conocidos en química de proteína
20 sintética, en los que se incluyen aquellos que involucran agentes de reticulación. Por ejemplo, inmunotoxinas puede ser construidas utilizando una región de intercambio de disulfuro o al formar un enlace de tioéster. Ejemplos de reactivos apropiados para este propósito incluyen
25 iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y aquellos revelados, por ejemplo, en la patente estadounidense No. 4,676,980.

Además, se pueden generar anticuerpos de un dolo dominio a OX40. Ejemplos de esta tecnología han sido

20

descritos en WO 9425591 para anticuerpos derivados de Ig de cadena pesada de Camelidae, también como en US 20030130496 que describe el aislamiento de anticuerpos plenamente humanos de un solo dominio a partir de bibliotecas de fago.

5 También se puede crear moléculas de enlace de cadena de un solo péptido en las cuales las regiones de Fv de cadena pesada y ligera están unidas. Anticuerpos de una sola cadena ("scFv") y el método de su construcción son descritos en la patente estadounidense No. 4,946,778.

10 Alternativamente, el Fab puede ser construido y expresado por medios similares. Todos los anticuerpos total y parcialmente humanos son menos inmunógenos que los mAb completamente murinos y los fragmentos y anticuerpos de una sola cadena son también menos inmunógenos.

15 Anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden ser aislados a partir de bibliotecas de fago de anticuerpo generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty, et al., *Nature* 348:552 (1990). Clarkson, et al., *Nature* 352:624 (1991) y Marks, et al., *J Mol Biol* 222:581 (1991)

20 describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fago. Publicaciones subsecuentes describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante entremezcla de cadena (Marks, et al.,

25 *Bio/Technology* 10:779 (1992)), también como infección combinatorial y recombinación in vivo como una estrategia para construir bibliotecas de fago muy grandes (Waterhouse, et al., *Nuc Acids Res* 21:2265 (1993)). Así, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de

21.

anticuerpo monoclonales tradicionales para aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede ser modificado, por ejemplo, al sustituir la secuencia de codificación por dominios
5 constantes de cadena pesada y cadena ligera humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente estadounidense No. 4,816,567; Morrison, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 81 :6851 (1984)).

Otra alternativa es usar fusión eléctrica en
10 lugar de fusión química para formar hibridomas. Esta técnica está bien establecida. En lugar de fusión, se puede transformar también una célula B para hacerla inmortal utilizando por ejemplo un virus de Epstein Barr o un gen transformante. Véase, por ejemplo, "Continuously
15 Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity" Zurawaki, et al., en *Monoclonal Antibodies*, ed. by Kennett, et al., Plenum Press, pp.19-33. (1980)). Los mAb de anti-OX40 pueden ser criados al inmunizar roedores (por ejemplo, ratones, ratas, hámsters y
20 conejillos de indias) con proteína OX40, proteína de fusión o sus fragmentos expresados por sistemas ya sea eucarióticos o procarióticos. Otros animales pueden ser usados para inmunización, por ejemplo, primates no humanos, inmunoglobulinas de expresión de ratones transgénicos y
25 ratones inmunodeficientes combinados severo (SCID) trasplantados con linfocitos B humanos. Hibridomas pueden ser generados mediante procedimientos convencionales al fusionar linfocitos B de los animales inmunizados con células de mieloma (por ejemplo, Sp2/0 y NSO), como se

describe anteriormente (Kohler, et al., Nature 256:495 (1975)). Además, anticuerpos anti-OX40 pueden ser generados mediante selección de bibliotecas Fv o Fab de una sola cadena recombinante a partir de linfocitos B humanos en sistemas de despliegue de fago. La especificidad de los mAb a OX40 puede ser probada mediante ELISA, Western immunoblotting u otras técnicas inmunoquímicas. La actividad inhibidora de los anticuerpos sobre la activación de célula T de CD4+ puede ser determinada mediante proliferación, liberación de citocina y análisis de apoptosis. Los hibridomas en las células positivas son clonados mediante dilución limitante. Los anticuerpos son purificados para caracterización por especificidad a OX40 humano mediante los análisis descritos anteriormente.

IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-OX40 ANTAGONISTAS

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales antagonistas que inhiben y neutralizan la acción de OX40. En particular, los anticuerpos de la presente invención se enlazan e inhiben la activación de OX40. Los anticuerpos de la presente invención incluyen los anticuerpos designados como A10 y B66 y anticuerpos humanizados de estos anticuerpos murinos son revelados. La presente invención también incluyen anticuerpos que se enlazan al mismo epítipo como uno de estos anticuerpos, por ejemplo, aquel del anticuerpo monoclonal A10(TH)hu336F.

Anticuerpos anti-OX40 candidatos fueron seleccionados utilizando: (1) tecnología de análisis microvolumétrico fluorométrico (FMAT) (Applied Biosystem, CA),

21

(2) un análisis inmuno-absorbente enzima-enlazado (ELISA) y
(3) un inmunoanálisis de citometría de flujo. Los análisis
efectuados para caracterizar los anticuerpos escogidos
incluyeron: (1) análisis de Hut-78; (2) análisis de célula
5 T de CD4+ natural; (3) condiciones TH1, TH2 y TH17; (4)
protocolo de célula T CD4+ natural TCR-activada; (5)
Análisis de apoptosis y (6) prueba de reactividad cruzada.
Detalles experimentales son descritos en los ejemplos.

Los anticuerpos de la invención incluyen, pero no
10 están limitados a, anticuerpos policlonales, monoclonales,
monovalentes, bisespecíficos, heteroconjugados,
multiespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos,
anticuerpos de una sola cadena, anticuerpos de un solo
dominio, fragmentos de Fab, fragmentos de F(ab'),
15 fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de
Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (en los que se
incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-Id a anticuerpos de
la invención) y fragmentos de enlace de epítipo de
cualquiera de los anteriores.

20 Las moléculas de inmunoglobulina de la invención
pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM,
IgD, IgA y IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3,
IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase de molécula de
inmunoglobulina. Los anticuerpos pueden ser fragmentos de
25 anticuerpo de enlace de antígeno de la presente invención e
incluyen, pero no están limitados a, Fab, Fab' y F(ab')₂,
Fd, Fv de una sola cadena (scFv), anticuerpos de una sola
cadena, Fv disulfuro-enlazados (sdFv) y anticuerpos de un
solo dominio que comprenden ya sea un dominio VL o VH.

Fragmentos de anticuerpo de enlace de antígeno, en los que se incluye anticuerpos de una sola cadena, pueden comprender la(s) región(es) variable(s) sola o en combinación con la totalidad o una porción de los siguientes: región de engozne, dominios CH1, CH2 y CH3. También incluidos en la invención se encuentran fragmentos de enlace de antígeno que comprenden cualquier combinación de región(es) variable(s) con una región de articulación o engozne, dominios CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier origen animal en los que se incluyen aves y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son de humano, primates no humanos, roedores (por ejemplo, ratón y rata), burro, oveja, conejo, cabra, conejillo de indias, camello, caballo o pollo.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, trisespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítomos de OX40 o pueden ser específicos para ambos OX40 también como para un epítomo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Véase, por ejemplo, publicaciones de PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., *J Immunol* 147:60 (1991); patentes estadounidenses Nos. 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,819; Kostelny, et al., *J Immunol* 148:1547 (1992).

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser descritos o especificados en términos del (los) epítomo(s) o porción(es) de OX40 que reconocen o enlazan

específicamente. El (los) epítipo(s) o porción(es) de polipéptido puede(n) ser especificado(s) como se describe en la presente, por ejemplo, mediante posiciones N-terminal y C-terminal, por tamaño en residuos de aminoácidos contiguos o enlistados en las tablas y figuras.

Los anticuerpos de la presente invención pueden también ser descritos o especificados en términos de su reactividad cruzada. Los anticuerpos que se enlazan a polipéptidos de OX40, que tienen por lo menos 95%, por lo menos 90%, por lo menos 85%, por lo menos 80%, por lo menos 75%, por lo menos 70%, por lo menos 65%, por lo menos 60%, por lo menos 55% y por lo menos 50% de identidad (tal como se calcula utilizando métodos conocidos en el arte y descritos en la presente) a OX40 están también incluidos en la presente invención. Los anticuerpos anti-OX40 también se pueden enlazar con una KD de menos de aproximadamente 10^{-7} M, menos de aproximadamente 10^{-6} M o menos de aproximadamente 10^{-5} M a otras proteínas, tales como anticuerpos anti-OX40 de una especie diferente que contra la cual el anticuerpo anti-OX40 es dirigido.

En modalidades específicas, los anticuerpos de la presente invención pueden reaccionar de manera cruzada con otros homólogos mamíferos de OX40 humano y los epítopos correspondientes del mismo. En una modalidad específica, la reactividad cruzada descrita anteriormente es con respecto a cualquier antígeno específico o polipéptido inmunógeno o combinación(es) del antígeno específico y/o polipéptidos inmunógenos revelados en la presente.

Incluidos además en la presente invención se

encuentran anticuerpos que se enlazan a polipéptidos codificados por polinucleótidos que se hibridizan a un polinucleótido que codifica OX40 bajo condiciones de hibridización severas. Los anticuerpos de la presente
5 invención pueden también ser descritos o especificados en términos de su afinidad de enlace a un polipéptido de la invención. Afinidades de enlace preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación al equilibrio o KD de 10^{-8} a 10^{-15} M, 10^{-8} a 10^{-12} M, 10^{-8} a 10^{-10} M o 10^{-10} a 10^{-12}
10 M. La invención también proporciona anticuerpos que inhiben competitivamente el enlace de un anticuerpo a un epítipo de la invención tal como se determina mediante cualquier método conocido en el arte para determinar el enlace competitivo, por ejemplo los inmunoanálisis descritos en la
15 presente. En modalidades preferidas, el anticuerpo inhibe competitivamente el enlace al epítipo por al menos 95%, por lo menos 90%, por lo menos 85%, por lo menos 80%, por lo menos 75%, por lo menos 70%, por lo menos 60% o por lo menos 50%.

20

VECTORES Y CÉLULAS HUÉSPED

En otro aspecto, la presente invención proporciona secuencias de ácidos nucleicos aislados que codifican un anticuerpo como se revela en la presente,
25 constructos de vector que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos de la presente invención, células huésped que comprenden tal vector y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo.

Para la producción recombinante del anticuerpo,

77

el ácido nucleico que codifica es aislado e insertado a un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo es fácilmente aislado y secuenciado
5 procedimientos convencionales (por ejemplo, al usar sondas de oligonucleótidos que son aptas de enlazarse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Técnicas estándar para clonación y transformación pueden ser usadas en la preparación de
10 líneas celulares que expresan los anticuerpos de la presente invención.

VECTORES

Muchos vectores están disponibles. Los
15 componentes de vector incluyen en general, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento mejorador, un promotor y una secuencia de terminación de transcripción. Vectores de
20 expresión recombinantes que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos de la presente invención pueden ser preparados utilizando técnicas bien conocidas. Los vectores de expresión pueden incluir una secuencia de nucleótidos enlazada operativamente a
25 secuencias de nucleótidos reguladoras transcripcionales o traduccionales apropiadas tales como aquellas derivadas de genes mamíferos, microbianos, virales o de insectos. Ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores transcripcionales, operadores, mejoradores, sitios de

enlace ribosomal de mRNA y/u otras secuencias apropiadas que controlan el inicio y terminación de la transcripción y traducción. Las secuencias de nucleótidos son "enlazadas operativamente" cuando la secuencia reguladora se relaciona funcionalmente a la secuencia de nucleótidos por el polipéptido apropiado. Así, una secuencia de nucleótidos de promotor es enlazada operativamente a, por ejemplo, la secuencia de cadena pesada de anticuerpo si la secuencia de nucleótidos del promotor controla la transcripción de la secuencia de nucleótidos apropiada. Un ejemplo de un vector de expresión útil para expresar los anticuerpos de la presente invención se puede encontrar en la solicitud WO 04/070011, que es incorporada en la presente por referencia.

Además, secuencias que codifican péptidos de señal apropiados que no están normalmente asociados con secuencias de cadena pesada y/o cadena ligera de anticuerpo pueden ser incorporadas a vectores de expresión. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos para un péptido de señal (líder secretorio) puede ser fusionado en cuadro a la secuencia de polipéptidos, de tal manera que el anticuerpo es secretado a espacio periplásmico o al medio. Un péptido de señal que es funcional en las células huésped propuestas mejora la secreción extracelular del anticuerpo apropiado. El péptido de señal puede ser escindido del polipéptido después de la secreción del anticuerpo de la célula. Ejemplos de tales señales secretorias son bien conocidas e incluyen, por ejemplo, aquellas descritas en las patentes estadounidenses Nos. 5,698,435; 5,698,417; y 6,204,023.

CÉLULAS HUÉSPED

Las células huésped útiles en la presente invención son células procarióticas, de levadura o células eucarióticas superiores e incluyen pero no están limitadas a microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o vectores de expresión de ADN o cósmido que contienen secuencias de codificación de anticuerpo; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen secuencias de codificación de anticuerpo; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; sistemas de células de plantas infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus de mosaico de coliflor, CaMV, virus de mosaico de tabaco, CMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contiene secuencias de codificación de anticuerpo o sistemas de células mamíferas (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células mamíferas (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K de virus de vacuna).

Procariontes útiles como células huésped en la

20

presente invención incluyen organismos gram negativos o gram positivos tales como *E. coli*, *B. subtilis*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* y *Shigella*, también como Bacilli, Pseudomonas y Streptomyces. Un huésped de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31,446) aunque otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) son apropiados. Estos ejemplos son ilustrativos. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

Los vectores de expresión para uso en células huésped procarióticas comprenden en general uno o más genes marcadores seleccionables fenotípicos. Un gen marcador seleccionable fenotípico es por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a antibiótico o que suministra un requerimiento autotrófico. Ejemplos de vectores de expresión útiles para células huésped procarióticas incluyen aquellos derivados de plásmidos disponibles comercialmente tales como la serie de vectores pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), pGEM1 (Promega Biotec, Madison, Wisconsin, EUA) y el pET (Novagen, Madison, Wisconsin, EUA) y pRSET (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, EUA) (Strudler, *J Mol Biol* 219: 37 (1991); Schoepfer, *Gene* 124: 83 (1993)). Secuencias de promotor usadas comúnmente para vectores de expresión de células huésped procarióticas recombinantes incluyen T7 (Rosenberg, et al., *Gene* 56: 125 (1987)), β -lactamasa (penicilinas), sistema promotor de lactosa (Chang, et al., *Nature* 275: 615 (1978); Goeddel, et

al., *Nature* 281: 544 (1979)), sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel, et al., *Nucl Acids Res* 8: 4057 (1980)) y promotor *tac* (Sambrook, et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory (1990)).

Levaduras u hongos filamentosos útiles en la presente invención incluyen aquellos de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Actinomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaxxharomyces*, *Candida*, *Trichoderma*, *Neurospora* y hongos filamentosos tales como *Neurospora*, *Penicillium*, *Tilypocladium* y *Aspergillus*. Los vectores de levadura frecuentemente contendrán una secuencia de origen de replicación de un plásmido de levadura 2μ, una secuencia autónomamente replicante (ARS), una región de promotor, secuencias para poliadenilación, secuencias para terminación de transcripción y un gen marcador seleccionable. Secuencias de promotor apropiadas para vectores de levadura incluyen, entre otros, promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato cinasa (Holland, et al., *Biochem.* 17: 4900 (1978)) tal como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa. Otros vectores y promotores apropiados para uso en expresión de levaduras son descritos además en Fleer, et al., *Gene* 107: 285 (1991). Otros vectores y promotores apropiados para levaduras y protocolos de transformación de levaduras son bien conocidos en el arte.

or

Los protocolos de transformación de levaduras son bien conocidos. Uno de tales protocolos es descrito por Hunnen, et al., *Proc Natl Acad. Sci* 75: 1959 (1978). El protocolo de Hinnen selecciona transformantes de Trp⁺ en un medio selectivo.-

Los sistemas de cultivo de célula huésped mamíferos o de insectos pueden también ser empleados para expresar anticuerpos recombinantes. En principio, cualquier cultivo celular eucariótico superior es trabajable, ya sea de cultivo de vertebrado o cultivo de invertebrado. Ejemplos de células invertebradas incluyen células de plantas y células de insectos (Luckow, et al., *Nio/Technology* 6: 47 (1988); Miller, et al., *Genetics Engineering*, Setlow, et al., editores, Volumen 8, pp. 277-9, Plenum Publishing (1986); Mseda, et al., *Nature* 315: 592 (1985)). Por ejemplo, los sistemas de Baculovirus pueden ser usados para la producción de proteínas heterólogas. En un sistema de insectos, un virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) puede ser usado como vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia de codificación del anticuerpo puede ser clonada individualmente a regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y colocada bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, en el promotor de polihedrina). Otros huéspedes que han sido identificados incluyen *Aedes*, *Drosophila melanogaster* y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas virales para transfección están disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-1 de AcNPV y la cepa Bm-5 de

Bombyx mori NPV y tales virus pueden ser usados como el virus en la presente de acuerdo con la presente invención, particularmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Además, cultivos celulares de plantas de algodón, maíz, patata, soya, petunia, tomate y tabaco pueden también ser utilizados como huéspedes.

Las células de vertebrados y propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejido) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Véase Tissue Culture, Kruse, et al., editores, Academic Press (1973). Ejemplos de líneas celulares huéspedes mamíferas útiles son riñón de mono; línea de riñón embrionario humano; células de riñón de hámster bebé; células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub, et al., *Proc Natl Acad Sci EUA* 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón; células de carcinoma cervical de humano (HELA); células de riñón canino; células de pulmón humano; células de hígado humano; tumor mamario de ratón y células NS0.

Las células huésped son transformadas con los vectores descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y cultivadas en medios nutrientes convencionales modificadas como sea apropiado para inducir promotores, secuencias de control de transcripción y traducción, selección de transformantes o amplificación de los genes que codifican las secuencias deseadas. Las secuencias de promotor usadas comúnmente y secuencias de mejorador son derivadas de virus de polio, Adenovirus 2, virus Simio 40 (SV40) y citomegalovirus humano (CMV). Las secuencias de ADN derivadas del genoma viral SV40 pueden

ser usadas para proveer otros elementos genéticos para expresión de una secuencia genética estructural en una célula huésped mamífera, por ejemplo, origen SV40, promotor prematuro y tardío, mejorador, empalme en sitios de poliadenilación. Los promotores tardío y temprano virales son particularmente útiles debido a que ambos son obtenidos fácilmente de un genoma viral como un fragmento que puede también contener un origen de replicación viral. Vectores de expresión ejemplares para uso en células huésped mamíferas están disponibles comercialmente.

Las células huésped usadas para producir el anticuerpo de esta invención pueden ser cultivadas en una variedad de medios. Medios disponibles comercialmente tales como F10 de Ham (Sugma), Medio Esencial Mínimo (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma) son apropiados para cultivar células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham, *et al.*, *Meth. Enzymol.* 58: 44 (1979), Barnes, *et al.*, *Anal Biochem* 102: 255 (1980) y Patentes Estadounidenses Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,560,655; 5,122,469; 5,712,163 o 6,048,728 pueden ser usados como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios pueden ser complementados como sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como X-cloruros, en donde X es sodio, calcio, magnesio y fosfatos), soluciones reguladoras del pH (tal como HEPES), nucleótidos (tal como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos en traza

(definidos como compuestos inorgánicos presentes usualmente a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualesquier otros complementos necesarios pueden también ser incluidos a concentraciones apropiadas que serían conocidas por aquellos experimentados en el arte. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y los semejantes, son aquellos previamente usados con la célula huésped seleccionada para expresión y serán evidentes para el técnico experimentado en el arte.

POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN ANTICUERPOS

La invención provee además polinucleótidos o ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN, que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de la invención y fragmentos del mismo. Polinucleótidos ejemplares en los que se incluyen aquellos que codifican cadenas de anticuerpo que comprenden una o más de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente. La invención también abarca polinucleótidos que se utilizan bajo condiciones de hibridización severos o de severidad más baja o de polinucleótidos que codifican un anticuerpo de la presente invención.

Los polinucleótidos pueden ser obtenidos y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos determinada mediante cualquier método conocido en el arte. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótidos del anticuerpo es conocida, un polinucleótido que codifica el anticuerpo puede ser ensamblado a partir de oligonucleótidos sintetizados

químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier, et al., *Bio/Techniques* 17: 242 (1994)), que brevemente, involucra la síntesis de oligonucleótidos traslapantes que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, recocido y ligación de aquellos oligonucleótidos y luego amplificación de los oligonucleótidos ligados mediante PCR.

Alternativamente, un polinucleótido que codifica un anticuerpo puede ser generado a partir de ácidos nucleicos de una fuente apropiada. Si un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular no está disponible, pero la secuencia de la molécula de anticuerpo es conocida, un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina puede ser sintetizado químicamente u obtenido de una fuente apropiada (por ejemplo, una biblioteca de cADN anticuerpo o una biblioteca de cADN generada a partir de o ácido nucleico, preferiblemente ARN poli A⁺ aislado de cualesquier tejido o células que expresan el anticuerpo, tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo de la invención) mediante amplificación de PCR utilizando cebadores sintéticos hibridizables a los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación utilizando una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia genética particular para identificar, por ejemplo, un clon de cADN de una biblioteca de cADN que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados mediante PCR pueden luego ser clonados a vectores de clonación replicables utilizando cualquier método conocido en el arte.

7

Una vez que la secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos correspondientes del anticuerpo es determinada, la secuencia de nucleótidos del anticuerpo puede ser manipulada utilizando métodos bien conocidos en el arte para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutaciones bien dirigida al sitio, PCR, etc. (véase por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory (1990); Ausubel, *et al.*, editores, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1998), que son ambas incorporadas por referencia en la presente en su totalidad), para generar anticuerpos que tienen una secuencia diferente de aminoácidos, por ejemplo, para crear sustituciones, cancelaciones y/o inserciones de aminoácidos.

En una modalidad específica, la secuencia de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada y/o ligera puede ser inspeccionada para identificar las secuencias de las CDR mediante métodos bien conocidos, por ejemplo, por comparación de secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de cadenas pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencias. Utilizando técnicas de ADN recombinantes de rutina, una o más de las CDR pueden ser insertadas dentro de las regiones de estructura, por ejemplo, a regiones de estructura humanas para humanizar un anticuerpo no humano, como se describe en *supra*. Las regiones de estructura pueden ser regiones que se presentan de manera estable en

82

la naturaleza o regiones de estructura de consenso y preferiblemente regiones de estructura humana (véase por ejemplo, Chothia, et al., *J Mol Biol* 278: 457 (1998) para un listado de regiones de estructura humanas).

5 Preferiblemente, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones de estructura y CDR codifica un anticuerpo que se enlaza específicamente a un polipéptido de la invención. Preferiblemente, como se discute en *supra*, una o más sustituciones de aminoácidos se pueden hacer

10 dentro de las regiones de estructura y preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos mejoran el enlace del anticuerpo a su antígeno. Adicionalmente, tales métodos pueden ser usados para efectuar sustituciones o cancelaciones de aminoácidos de uno o más residuos de

15 cisteína de región variable que participan en un enlace de disulfuro de intracadena para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces de disulfuro de intracadena. Otras alteraciones al polinucleótido están abarcadas por la presente invención y dentro de la

20 habilidad del arte.

Además, técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison, et al., *Proc Natl Acad Sci* 81: 851 (1984); Neuberger, et al., *Nature* 312: 604 (1984); Takeda, et al., *Nature* 314: 452 (1985) al empalmar

25 genes de una molécula del anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano y actividad biológica apropiada pueden ser usadas. Como se describe *supra*, un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual diferentes

82

porciones son derivadas de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana, por ejemplo, anticuerpos humanizados.

5 Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de una sola cadena (Patente Estadounidense No. 4,946,778; Bird, *Science* 242: 423 (1988); Huston, et al., *Proc Natl Acad Sci EUA* 85: 5879 (1988) y Ward, et al., *Nature* 334: 544 (1989)) pueden ser
10 adaptadas para producir anticuerpos de una sola cadena. Los anticuerpos de una sola cadena son formados al enlazar los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv vía un puente de aminoácido, dando como resultado un polipéptido de una sola cadena. Técnicas para el ensamble de fragmentos
15 Fv funcionales en *E. coli* pueden también ser usados (Skerra, et al., *Science* 242: 1038 (1988)).

MÉTODOS PARA PRODUCIR ANTICUERPOS ANTI-OX40

Los anticuerpos de la invención pueden ser
20 producidos mediante cualquier método conocido en el arte para síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o preferiblemente mediante técnicas de expresión recombinante.

La expresión recombinante de un anticuerpo de la
25 invención o fragmento, derivado o análogo del mismo (por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención o un anticuerpo de una sola cadena de la invención) requiere la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el

anticuerpo o un fragmento del anticuerpo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo, el vector para la producción del anticuerpo puede ser producido mediante tecnología de ADN recombinante. Un vector de expresión es construido que contiene secuencias de codificación de anticuerpos y señales de control de transducción y traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinantes *un vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*.

El vector de expresión es transferido a una célula huésped mediante técnicas convencionales y luego las células transfectadas son cultivadas mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención. En un aspecto de la invención, vectores que codifican tanto las cadenas pesadas como ligeras pueden ser co-expresados en la célula huésped para la expresión de toda la molécula de inmunoglobulina como se detalla posteriormente en la presente.

Una variedad de sistemas de vector de expresión de huésped pueden ser utilizados para expresar las moléculas de anticuerpo de la invención como se describe anteriormente. Tales sistemas de expresión de huésped representan vehículos por los cuales las secuencias de codificación de interés pueden ser producidas y purificadas subsecuentemente, pero también representan células que puede, cuando son transformadas o transfectadas con las secuencias de codificación de nucleótidos apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in*

situ. Células bacterianas tales como *E. coli* y células eucarióticas son usadas comúnmente para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante, especialmente para la producción de molécula de anticuerpo recombinante entera. Por ejemplo, células mamíferas tales como CHO, en 5 conjunción con un vector tal como el elemento de promotor de gen, prematuro intermedio mayor de citomegalovirus humano, son un sistema de expresión efectivo para anticuerpos (Foecking, et al., *Gene* 45: 101 (1986); 10 Cockett, et al., *Bop/Technology* 8: 2 (1990)).

Además, una cepa de célula huésped puede ser escogida que modula la expresión de las secuencias insertadas o modifica y procesa el producto genético de la manera específica deseada. Tales modificaciones (por 15 ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos de proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el proceso pos-traducción y modificación de la estructura y 20 productos genéticos. Líneas celulares o sistemas huésped apropiados pueden ser obtenidos para asegurar la modificación correcta y procesamiento de la proteína extraña expresada. Para este fin, las células huésped eucarióticas que posee la maquinaria celular para el 25 procesamiento apropiado del transcripto primario, glicosilación y fosforilación del producto pueden ser usados. Tales células huésped mamíferas incluyen pero no están limitadas a CHO, COS, 293, 3T3 o células de mieloma.

Para la producción de alto rendimiento a largo

plazo de proteínas recombinantes, la expresión estable es preferida. Por ejemplo, se pueden diseñar líneas celulares que expresan establemente la molécula de anticuerpo. En lugar de usar vectores de extensión que contienen orígenes de replicación viral, las células huésped pueden ser transformadas con ADN controlado mediante elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo, promotor, mejorador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Enseguida de la introducción del ADN extraño, se puede permitir que las células diseñadas crezcan por uno a dos días en un medio enriquecido y luego son cambiadas a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el plásmido a sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden ser clonados y expandidos a líneas celulares. Este método puede ser usado ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresan la molécula de anticuerpo. Tales líneas celulares diseñadas pueden ser particularmente útiles en la selección y evaluación de compuestos que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Un número de sistemas de selección pueden ser usados, en los que se incluyen pero no limitados los genes de timidina kinasa de virus de herpes simplex (Wigler, et al., Cell 11:223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska, et al., Proc Natl Acad Sci USA 48:202 (1992)) y adenina fosforibosiltransferasa

92

(Lowy, et al., Cell 22:817 (1980)) en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. También, se puede usar la resistencia a antimetabolito como la base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler, et al., Proc Natl Acad Sci USA 77:357 (1980); O'Hare, et al., Proc Natl Acad Sci USA 78: 1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan, et al., Proc Natl Acad Sci USA 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Wu, et al., Biotherapy 3:87 (1991)) e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre, et al., Gene 30: 147 (1984)). Métodos conocidos comúnmente en el arte de tecnología de ADN recombinante pueden ser aplicados sistemáticamente para seleccionar el clon recombinante deseado y tales metodos son descritos, por ejemplo en Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press (1990) y en capítulos 12 y 13, Dracopoli, et al., ed, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons (1994); Colberre-Garapin, et al., J Mol Biol 150:1 (1981), que son incorporadas por referencia de la presente en su totalidad.

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden ser incrementados por amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington, et al., "The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells," DNA Cloning, Vol.3. Academic Press (1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa el anticuerpo es

9

amplificable, el incremento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped incrementará el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada está asociada con el gen de anticuerpo, la
5 producción del anticuerpo también se incrementará (Crouse, et al., Mol Cell Biol 3:257 (1983)).

La célula huésped puede ser co-transfectada con dos vectores de expresión de la invención, el primer vector que codifica un polipéptido derivado de cadena pesada y el
10 segundo vector que codifica un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, un solo vector puede ser usado que codifica y es apto de
15 expresar tanto polipéptidos de cadena pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debe ser colocada antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre toxica (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc Natl Acad Sci USA 77:2197 (1980)). Las
20 secuencias de codificación para las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender cADN o ADN genómico.

Una vez que una molécula de anticuerpo de la invención ha sido producida por un animal, sintetizada químicamente o expresada recombinantemente, puede ser
25 purificada mediante cualquier método conocido en el arte para purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo mediante cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de proteína A y

94

cromatografía de exclusión de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden ser fusionados a secuencias de polipéptidos heterólogos descritas en la presente o de otra manera conocidos en el arte para facilitar la purificación.

La presente invención abarca anticuerpos fusionados recombinantemente o conjugados químicamente (en los que se incluyen tanto conjugaciones covalentes como no covalentes) a un polipéptido. Anticuerpos fusionados o conjugados de la presente invención pueden ser usados por facilidad en purificación. Véase, por ejemplo, PCT publication WO 93/21232; EP 439,095; Naramura, et al., Immunol Lett 39:91 (1994); patente estadounidense 5,474,981; Gillies, et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:1428 (1992); Fell, et al., J Immunol 146:2446 (1991), que son incorporadas por referencia en su totalidad.

Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención pueden ser fusionados a secuencias de marcador, tal como un péptido, para facilitar la purificación. En modalidades preferidas, la secuencia de aminoácidos de marcador es un péptido de hexa-histidina, tal como el marcador provisto en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, California, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponible comercialmente. Como se describe en Gentz, et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:821 (1989), por ejemplo hexa-histidina proporciona la purificación conveniente de la proteína de

9/

fusión. Otros marcadores de péptido útiles para purificación incluyen pero no están limitados al marcador "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína de hemaglutinina de influenza (Wilson, et al., Cell 31:161
5 (1984)) y el marcador "flag".

PURIFICACION DE ANTICUERPO

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede ser producido intracelularmente, en el
10 espacio periplásmico o secretado directamente al medio. Si el anticuerpo es producido intracelularmente, como primera etapa, los desechos de partículas, ya sea células huésped o fragmentos sometidos a lisis, pueden ser removidos, por ejemplo mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter,
15 et al., Bio/Technology 10: 163 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico de E. coli. Brevemente, la pasta celular es deshelada en presencia de acetato de sodio (pH 3.5), EDTA y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante
20 aproximadamente 30 minutos. Los desechos celulares pueden ser removidos mediante centrifugación. En donde el anticuerpo es secretado al medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión son en general concentrados primero utilizando un filtro de concentración de proteína
25 disponible comercialmente, por ejemplo una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de protiasa tal como PMSF puede ser incluido en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteolisis y se pueden incluir antibióticos para impedir el crecimiento de

26

contaminantes adventicios.

La composicion de anticuerpo preparada a partir de las células puede ser purificada utilizando, por ejemplo cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis de gel, 5 diálisis y cromatografía de afinidad, la cromatografía de afinidad es la técnica de purificación preferida. La conveniencia de la proteína A como ligante de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio de Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La 10 proteína A puede ser usada para purificar anticuerpos que están basados en cadenas pesadas de IgG1, IgG2 o IgG4 humanos (Lindmark, et al., J Immunol Meth 62:1 (1983)). La proteína G es recomendada para todos los isotipos de ratón y para IgG3 humana (Guss, et al., EMBO J 5:1561 (1986)). La 15 matriz a la cual el ligado de afinidad es anexado es más frecuentemente agarosa, pero otras matrices están disponibles. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o de poli(estirenedivinil)benceno permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempo de 20 procesamiento más cortos que pueden ser obtenidos con agarosa. En donde el anticuerpo comprende un dominio de CH3, la resina ABXTM de Bakerbond (J. T. Baker; Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. Otras técnicas para purificación de proteínas tales como 25 fraccionamiento o columna de intercambio iónico, precipitación de etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina, cromatografía de SEPHAROSE™ o sobre una resina de intercambio aniónico o cationico (tal como una columna de

97

ácido poliaspártico), cromatoenfoque, SDS-PAGE y precipitación de sulfato de amonio están también disponibles, dependiendo del anticuerpo a ser recuperado. Enseguida de cualesquier etapas de purificación preeliminarias, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede ser sometida a cromatografía de interacción hidrofóbica de bajo pH utilizando una solución reguladora del pH de elución a un pH de entre aproximadamente 2.5-4.5, efectuada preferiblemente a bajas concentraciones de sal (por ejemplo, sal de aproximadamente 0-0.25 M).

FORMULACIONES FARMACEUTICAS

Formulaciones terapéuticas del polipéptido o anticuerpo pueden ser preparadas para almacenamiento como formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas al mezclar el polipéptido que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores "aceptables farmacéuticamente" opcionales usados comúnmente en el arte (todos los cuales son denominados "excipientes"), esto es, agentes reguladores del pH, agentes estabilizantes, conservadores, isotonificadores, detergentes no iónicos, antioxidantes y otros aditivos misceláneos. Véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol, Ed. (1980). Tales aditivos deben ser no tóxicos a los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas.

Los agentes reguladores del pH ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a condiciones

92

fisiológicas. Están preferiblemente presentes a una concentración que fluctúa de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. Agentes reguladores del pH apropiados para uso de la presente invención incluyen tanto

5 ácidos orgánicos como inorgánicos y sales de los mismos, tales como soluciones reguladoras del pH de citrato (por ejemplo, mezcla de citrato de monosodio-citrato de disodio, mezcla de ácido cítrico-citrato de trisodio, mezcla de ácido cítrico-citrato de monosodio, etc.), soluciones

10 reguladoras del pH de succinato (por ejemplo, mezcla de ácido succínico-succinato de monosodio, mezcla de ácido succínico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido succínico-succinato de sodio, etc.), soluciones reguladoras de pH de tartrato (por ejemplo, mezcla de ácido tartárico-tartrato

15 de sodio, mezcla de ácido tartárico-tartrato de potasio, mezcla de ácido tartárico-hidróxido de sodio, etc), soluciones reguladoras del pH de fumarato (por ejemplo mezcla de ácido fumárico-fumarato de monosodio, mezcla de ácido fumarico-fumarato de disodio, etc.), soluciones

20 reguladoras del pH de fumarato (por ejemplo mezcla de ácido fumarico-fumarato de monosodio, mezcla de fumarato de monosodio-fumarato de disodio, etc.), soluciones reguladoras del pH de gluconato (por ejemplo, mezcla de ácido glucónico-gluconato de sodio, mezcla de ácido glucónico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido glucónico-gluconato de potasio, etc.), soluciones reguladoras del pH

25 de oxalato (por ejemplo, mezcla de ácido oxálico-oxalato de sodio, mezcla de ácido oxálico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido oxálico-oxalato de potasio, etc.), soluciones

reguladoras del pH de lactato (por ejemplo, mezcla de ácido láctico-lactato de sodio, mezcla de ácido láctico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido láctico-lactato de potasio, etc.) y soluciones reguladoras del pH de acetato (por ejemplo, 5 mezcla de ácido acético-acetato de sodio, mezcla de ácido acético-hidróxido de sodio, etc.). Adicionalmente, se pueden mencionar soluciones reguladoras del pH de fosfato, soluciones reguladoras del pH de histidina y sales de trimetilamina tales como Tris.

10 Se pueden agregar conservadores para retardar el crecimiento microbiano y pueden ser agregados en cantidades que fluctúan de 0.2% - 1% (peso/volumen). Conservadores apropiados para uso con la presente invención incluyen fenol, alcohol bencílico, meta-cresol, metil paraben, 15 propil paraben, cloruro de octadecildimetilbencil amonio, haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro y yoduro), cloruro de hexametonio y alquil parabenes tales como metil o propil paraben, patecol, resorcinol, cicloexanol y 3-pentanol. Isotonificadores, algunas veces 20 conocidos como "estabilizadores" pueden ser agregados para asegurar la isotonicidad de la composición líquida de la presente invención e incluyen alcoholes de azúcar polihídricos, preferiblemente alcoholes trihídricos o alcoholes de azúcares superiores, tales como glicerina, 25 eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol.

Los estabilizadores se refieren a una amplia categoría de excipientes que pueden fluctuar en función desde un agente de volumen a un aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda a impedir la

No

desnaturalización o adherencia a la pared del recipiente. Estabilizadores típicos pueden ser alcoholes de azúcares polihídricos (enumerados anteriormente); aminoácidos tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, 5 histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc., azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar, tales como, lactosa, trehalosa, estaquiosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinisol, galactitol, glicerol y los semejantes, en los 10 que se incluyen ciclitos tales como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre tales como urea, glutatión, ácido tiotico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, alfa-monotioglicerol y tiosulfato de sodio; 15 polipéptidos de bajo peso molecular, (esto es <10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino, gelatina o inmunoglobulina; polímeros hidrofílicos tales como monosacáridos de polivinilpirrolidona, tales como xilosa, manosa, fructuosa, glucosa; disacáridos tales como lactosa, maltosa, sacarosa y trisacáridos tales como rafinosa y polisacáridos tales como dextrana. Los estabilizadores pueden estar presentes en el intervalo de 0.1 a 10,000 partes en peso de proteína activa.

Surfactantes no iónicos o detergentes (también conocidos como "agentes humectantes") pueden ser agregados para ayudar a solubilizar el agente terapéutico, también como para proteger la proteína terapéutica contra la agregación inducida por la agitación, que también permite

107

que la formulación quede expuesta a esfuerzo cortante en la superficie sin provocar desnaturalización de la proteína. Surfactantes no iónicos apropiados incluyen polisorbatos (20, 80, etc.), polioxámeros (184, 188 etc.), polioles
5 plurónicos, monoéteres de polioxietilensorbitan (TWEEN®-20, TWEEN®-80, etc.). Los surfactantes no iónicos pueden estar presentes en un intervalo de aproximadamente 0.05 mg/ml a aproximadamente 1.0 mg/ml, de preferencia aproximadamente 0.07 mg/ml a aproximadamente 0.2 mg/ml.

10 Excipientes misceláneos adicionales incluyen agentes de volumen (por ejemplo, almidón), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina, vitamina E) y co-solventes. La formulación en la presente puede también contener más de un
15 compuesto activo como sea necesario para la indicación particular que es tratada, preferiblemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proveer adicionalmente un agente inmunosupresor. Tales moléculas
20 están presentes apropiadamente en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito planeado. Los ingredientes activos pueden también estar atrapados en una microcápsula preparada por ejemplo mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por
25 ejemplo cápsulas de hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o

en macroemulsiones. Tales técnicas son reveladas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a. edición, Osal, Ed. (1980).

Las formulaciones a ser usadas para
5 administración in vivo deben ser estériles. Esto se efectúa
fácilmente, por ejemplo mediante filtración a través de
membranas de filtración estériles. Se pueden elaborar
preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos apropiados
de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices
10 semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que
contienen el anticuerpo, tales matrices están en forma de
artículos formados, por ejemplo películas o microcápsulas.
Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen
poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-
15 metacrilato), poli(alcohol vinílico)), polilacturos
(patente estadounidense 3,773,919), copolímeros de ácido L-
glutámico y L-glutamato de etilo, etileno - acetato de
vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico - ácido
glicólico no degradables, tales como LUPRON DEPOT™
20 (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido
láctico - ácido glicólico y acetato de leuproluro) y ácido
poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. En tanto que los polímeros
tales como etileno - acetato de vinilo y ácido láctico -
ácido glicólico permiten la liberación de moléculas por más
25 de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas por
períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos
encapsulados permanecen en el cuerpo por un tiempo largo se
pueden desnaturalizar o agregar como resultado de
exposición a humedad a 37°C, dando como resultado pérdida

102

de actividad biológica y posibles cambios en inmunogenicidad.

Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlace S-S intermolecular por medio de intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede ser obtenida al modificar los residuos de sulfhidrilo, liofilización de soluciones ácidas, control del contenido de humedad, uso de aditivos apropiados y desarrollo de composiciones de matriz poliméricas específicas.

La cantidad de polipéptido terapéutico, anticuerpo o fragmento del mismo que será efectiva en el tratamiento de una alteración o condición particular dependerá de la naturaleza de la alteración o condición y puede ser determinada mediante técnicas clínicas estándar. En donde sea posible, es deseable determinar la curva de respuesta a la dosis y las composiciones farmacéuticas de la invención primero in Vitro y luego en sistemas modelo de animales útiles antes de pruebas en animales.

En una modalidad preferida, una solución acuosa del polipéptido terapéutico, anticuerpo o fragmento del mismo es administrada mediante inyección subcutánea. Cada dosis puede fluctuar de aproximadamente 0.5 μg a aproximadamente 50 μg por kilogramo de peso corporal o más preferiblemente, de alrededor de 3 μg a aproximadamente 30 μg por kilogramo de peso corporal.

El horario de dosificación para administración subcutánea puede variar de una vez al mez a diariamente,

104

dependiendo de una diversidad de factores clínicos, en los que se incluyen el tipo de enfermedad, severidad de la enfermedad y sensibilidad del sujeto al agente terapéutico.

5 **USOS DE DIAGNÓSTICO PARA ANTICUERPOS ANTI-OX40**

Los anticuerpos de la invención incluyen derivados que son modificados, esto es, mediante la anexión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de tal manera que la anexión covalente no interfiere con el
10 enlace a OX40. Por ejemplo, pero no a manera de limitación, los derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, mediante biotinilación, HRP o cualquier otra porción detectable.

Los anticuerpos de la presente invención pueden
15 ser usados, por ejemplo, pero no limitados a, para purificar o detectar OX40, en los que se incluyen tanto métodos de diagnóstico *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos tienen uso en inmunoanálisis para medir cualitativa y cuantitativamente niveles de OX40 en muestras
20 biológicas. Véase, por ejemplo, Harlow, *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988), que es incorporado por referencia en la presente en su totalidad.

Como se discute en más detalle posteriormente en
25 la presente, los anticuerpos de la presente invención pueden ser usados ya sea solos o en combinación con otras composiciones. Los anticuerpos pueden además ser fusionados recombinantemente a un polipéptido heterólogo en el término N o C o conjugados químicamente (en los que se incluyen

107-

conjugaciones covalentes y no covalentes) a polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden ser fusionados recombinantemente o conjugados a moléculas útiles como marcadores en análisis
5 de detección.

La presente invención abarca además anticuerpos o fragmentos de los mismos conjugados a un agente de diagnóstico. Los anticuerpos pueden ser usados en diagnóstico, por ejemplo para detectar la expresión de un
10 objetivo de interés en células, tejidos o sueros específicos o para monitorear el desarrollo o avance de una respuesta inmunológica como parte de un procedimiento de pruebas clínicas para, por ejemplo determinar la eficacia de un régimen de un tratamiento dado. La detección puede
15 ser facilitada mediante acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales que
20 emiten positrón utilizando varias tomografías de emisión de positrón y iones de metal paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede ser acoplada o conjugada ya sea directamente al anticuerpo (o fragmento del mismo) o indirectamente por medio de un intermediario (tal como por
25 ejemplo, un enlazador conocido en el arte) utilizando técnicas conocidas en el arte. Ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente Estadounidense 4,737,456), luciferina, 2,3-

126

dihidrotalazinediona, malato dehidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano (HRPO), fosfatasa alcalina, beta. galactosidasa, glucoamilasa, lisosima, sacárido oxidasa (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa 5 oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tal como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y los semejantes.

Técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos son descritas en O'Sullivan, et al., "Methods for the 10 Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," in Methods in Enzymology, Langone, et al., eds. Pp. 147-66, Academic Press (1981). Véase, por ejemplo Patente Estadounidense 4,741,900 para iones de metal que pueden ser conjugados a anticuerpos para uso como 15 diagnóstico de acuerdo con la presente invención. Ejemplos de enzimas apropiadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos apropiados incluyen estreptavidina/biotina y 20 avidina/biodina; ejemplos de materiales fluorescentes apropiados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocinato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o picoeritrina; un ejemplo de material luminiscente incluye 25 luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y ecorina y ejemplos de materiales radiactivos apropiados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In o ^{99}Tc .

Algunas veces, el marcador es conjugado indirectamente con el anticuerpo. El experimentado en el

arte estará consciente de varias técnicas para obtener esto. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser conjugado con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de marcadores mencionados anteriormente pueden ser conjugados con avidina o viceversa. La biotina se enlaza selectivamente a avidina y así, el marcador puede ser conjugada con el anticuerpo de esta manera indirecta. Alternativamente, para obtener conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo, el anticuerpo es conjugado con un hapteno pequeño (por ejemplo, digloxina) y uno de los tres tipos diferentes de marcadores mencionados anteriormente es conjugado con un anticuerpo anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digloxina). Así, se puede obtener la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo.

En otra modalidad de la invención, el anticuerpo no necesita ser marcado y la presencia del mismo puede ser detectada utilizando un anticuerpo marcado que se enlaza al anticuerpo.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser empleados con cualquier método de análisis conocido, tales como análisis de enlace competitivo, análisis de empareados directo e indirecto y análisis de inmunoprecipitación. Véase Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158, CRC Press (1987).

Los análisis de enlace competitivos dependen de la habilidad de un estándar marcado para competir con la muestra de prueba por el enlace con una cantidad limitada de anticuerpos. La cantidad de objetivo de la muestra de

102

prueba es inversamente proporcional a la cantidad estándar que se enlaza a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad estándar que es enlazado, los anticuerpos en general son insolubilizados antes o después de la competencia. Como resultado, el estándar y la muestra de prueba que son enlazados a los anticuerpos pueden ser separados convenientemente del estándar y muestra de prueba que permanecen sin enlazar.

Los análisis de emparedado involucran el uso de dos anticuerpos, cada uno apto de enlace a una porción inmunógena diferente o epítipo o la proteína a ser detectada. En un análisis de emparedado, la muestra de prueba a ser analizada es enlazada por un primer anticuerpo que es inmovilizado sobre un soporte sólido y después de esto un segundo anticuerpo se enlaza a la muestra de prueba, formando así un complejo de tres partes insoluble. Véase, por ejemplo Patente Estadounidense 4,376,110. El segundo anticuerpo puede ser por sí mismo marcado con una porción detectable (análisis de emparedado directo) o puede ser medido utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que es marcado con una porción detectable (análisis de emparedado indirecto). Por ejemplo, un tipo de análisis de emparedado es un análisis de ELISA, en cuyo caso la porción detectable es una enzima.

Los anticuerpos pueden ser anexados a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoanálisis o purificación del antígeno objetivo. Tales soportes sólidos incluyen pero no están limitados a vidrio, celulosa, poliacrilamida, nylon, poliestireno, cloruro de

polivinilo o polipropileno. En este proceso, los anticuerpos son inmovilizados sobre un soporte sólido tal como resina SEPHADEXTM o papel filtro, utilizando métodos bien conocidos en el arte. Los anticuerpos inmovilizados son puestos en contacto con una muestra que contiene el objetivo a ser purificado y después de esto el soporte es lavado con un solvente apropiado que removerá sustancialmente todo el material en la muestra, excepto el objetivo a ser purificado, que es enlazado a los anticuerpos inmovilizados. Finalmente, el soporte es lavado con otro solvente apropiado, tal como solución reguladora de PH de glicina, que liberará el objetivo de los anticuerpos.

Los anticuerpos marcados y derivados y análogos de los mismos, que se enlazan específicamente a OX40, pueden ser usados por propósitos de diagnóstico para detectar, diagnosticar o monitorear enfermedades, alteraciones y/o condiciones asociadas con la expresión aberrante y/o actividad de OX40. La invención proporciona la detección de expresión aberrante de OX40 que comprende (a) analizar la expresión de OX40 en células o fluido corporal de un individuo utilizando uno o más anticuerpos de la presente invención específicos a OX40 y (b) comparar el nivel de expresión genética con un nivel de expresión de gen estándar, mediante lo cual un incremento o disminución en el nivel de expresión de OX40 analizado en comparación con el nivel de expresión estándar es indicador de expresión aberrante.

Los anticuerpos pueden ser usados para detectar

la presencia y/o niveles de OX40 en una muestra, por ejemplo un fluido corporal o muestra de tejido. El método de detección puede comprender poner en contacto la muestra con un anticuerpo de OX40 y determinar la cantidad de anticuerpo que es enlazada a la muestra. Para inmunohistoquímica, la muestra puede ser nueva o congelada o puede estar embebida en parafina y fija con un conservador tal como formalina, por ejemplo.

La invención proporciona un análisis de diagnóstico para diagnosticar una alteración, que comprende (a) analizar la expresión OX40 en células o fluido corporal de un individuo utilizando uno o más anticuerpos de la presente invención y (b) comparar el nivel de expresión genética con un nivel de expresión genética estándar, mediante lo cual un incremento o disminución en el nivel de expresión genética analizado en comparación con el nivel de expresión estándar es indicador de una alteración particular.

Los anticuerpos de la invención pueden ser usados para analizar niveles de proteína en una muestra biológica utilizando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos para aquéllos de habilidad en el arte (por ejemplo, véase Jalkanen, et al., *J. Cell Biol* 101:976 (1985); Jalkanen, et al., *J Cell Biol* 105:3087 (1987)). Otros métodos a base de anticuerpos útiles para detectar expresión genética de proteína incluyen inmunoanálisis, tal como el análisis inmunoabsorbente enlazado a enzima (ELISA) y el radioinmunoanálisis (RIA). Marcadores de análisis de anticuerpo apropiados son conocidos en el arte e incluyen

111

marcadores enzimáticos, tales como glucosa oxidasa, radioisótopos tales como yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{111}In) y tecnecio (^{99}Tc); marcadores luminiscentes, tales como luminol y
5 marcadores fluorescentes tales como fluoresceína, rodamina y biotina. Los isótopos radioisótopo-enlazado pueden ser localizados utilizando inmunoscintigrafía.

Un aspecto de la invención es la detección y diagnóstico de una enfermedad o alteración asociada con la
10 expresión aberrante de OX40 en un animal, preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un humano. En una modalidad, la diagnosis comprende: a) administrar (por ejemplo, parenteral, subcutánea o intraperitonealmente) a un sujeto una cantidad efectiva de una molécula marcada que
15 se enlaza específicamente a OX40; b) esperar un intervalo de tiempo enseguida de la administración que permite que la molécula marcada se concentre preferiblemente en sitios en el sujeto en donde el polipéptido es expresado (y para la molécula marcada sin enlazar a ser despejada a nivel de
20 fondo); c) determinar el nivel de fondo y d) detectar la molécula marcada en el sujeto, de tal manera que la detección de la molécula marcada por encima del nivel de fondo indica que el sujeto tiene una enfermedad o alteración particular asociada con la expresión aberrante
25 de OX40. El nivel de fondo puede ser determinado mediante varios métodos en los que se incluyen comparar la cantidad de molécula marcada detectada con un valor estándar previamente determinado para un sistema particular.

Se comprenderá en el arte que el tamaño del

sujeto y el sistema de formación de imagen usado determinarán la cantidad de porción de formación de imagen o porción de impresión necesaria para producir imágenes de diagnóstico. En el caso de una porción de radioisótopo, para un sujeto humano, la cantida de radiactividad inyectada fluctuará normalmente de alrededor de 5 a 20 milicurier de ^{99}Tc . El anticuerpo marcado o fragmento de anticuerpo se acumulará luego preferiblemente en el sitio de célula que contiene la proteína específica. La formación de imagen *in vivo* es descrita en Burchiel, et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments". Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, Burchiel, et al., eds., Masson Publishing (1982).

Dependiendo de varias variables, en las que se incluyen el tipo de marcador usado y el modo de administración, el intervalo de tiempo enseguida de la administración para permitir que la molécula marcada se concentre preferiblemente en sitios en el sujeto y para que la molécula marcada sin enlazar sea despejada a nivel de fondo es de 6 a 48 horas, 6 a 24 horas o 6 a 12 horas. En otra modalidad, el intervalo de tiempo enseguida de la administración es de 5 a 20 días o 5 a 10 días.

En una modalidad, el monitoreo de la enfermedad o alteración se lleva a cabo al repetir el método para diagnosticar la enfermedad o alteración, por ejemplo, un mes después de la diagnosis inicial, seis meses después de la diagnosis inicial, una año después de la diagnosis inicial, etc.

La presencia de la molécula marcada puede ser detectada en el paciente utilizando métodos conocidos en el arte para la formación de imagen in vivo. Estos métodos dependen del tipo de marcador usado. Aquél experimentado en el arte será apto de determinar el método apropiado para detectar un marcador particular. Métodos y dispositivos que pueden ser usados en los métodos de diagnóstico de la invención incluyen pero no están limitados a tomografía computarizada (CT), barrido corporal entero tal como tomografía de emisión de posición (PET), formación de imagen de resonancia magnética (MRI) y sonografía.

En una modalidad específica, la molécula es marcada con un radioisótopo y es detectada en el paciente utilizando un instrumento quirúrgico sensible a la radiación (Patente Estadounidense 5,441,050). En otra modalidad, la molécula es marcada con un compuesto fluorescente y es detectada en el paciente utilizando un instrumento de exploración o instrumento de barrido sensible a fluorescencia. En otra modalidad, la molécula es marcada con un metal que emite positrones y es detectada en el paciente utilizando tomografía de emisión de positrones. En todavía otra modalidad, la molécula es marcada con un marcador paramagnético y es detectada en un paciente utilizando formación de imagen de resonancia magnética (MRI).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para diagnosticar la predisposición de un paciente para desarrollar enfermedades provocadas por la expresión sin regular de citoquinas. Las cantidades

incrementadas de OX40 en ciertas células, tejidos o fluidos corporales del paciente pueden indicar que el paciente está predispuesto a ciertas enfermedades. En una modalidad, el método comprende recolectar una célula, tejido o muestra de
5 tejido corporal de un sujeto que se sabe que tiene niveles bajos o normales de OX40, analizar el tejido o fluido corporal en cuanto a la presencia de OX40 en el tejido y predecir la predisposición del paciente a ciertas enfermedades en base al nivel de expresión de OX40 en el
10 tejido o fluido corporal. En otra modalidad, el método comprende recolectar una muestra de célula, tejido o fluido corporal que se sabe que contiene un nivel de fluido de OX40 de un paciente, analizar el tejido o fluido corporal en cuanto a la cantidad de OX40 y predecir la
15 predisposición del paciente a ciertas enfermedades en base al cambio en la cantidad de OX40 en comparación con un nivel definido o probado establecido para célula normal, tejido o fluido corporal. El nivel definido de OX40 puede ser una cantidad conocida basada en valores de la
20 literatura o puede ser determinado de antemano al medir la cantidad en célula, tejido o fluidos corporales normales. Específicamente, la determinación de niveles de OX40 en ciertos tejidos o fluidos corporales permite la detección específica y prematura, preferiblemente antes de que la
25 enfermedad se presente en el paciente. Enfermedades que pueden ser diagnosticadas utilizando el método presente incluyen pero no están limitadas a, las enfermedades descritas en la presente. En la modalidad preferida, el tejido o fluido corporal es sangre periférica, leucocitos

115

de sangre periférica, tejidos de biopsia tales como biopsia de pulmón o piel y tejido.

El anticuerpo de la presente invención puede ser provisto en un kit, esto es, una combinación empacada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para efectuar el análisis de diagnóstico. En donde el anticuerpo es marcado con una enzima, el kit puede incluir sustratos y co-factores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, otros aditivos pueden ser incluidos, tales como estabilizadores, soluciones reguladoras de PH (por ejemplo, una solución reguladora de PH de bloqueo o una solución reguladora de PH de lisis) y los semejantes. Las cantidades relativas de los varios reactivos pueden ser variadas ampliamente para proveer concentraciones en solución de reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del análisis. Particularmente, los reactivos pueden ser provistos como polvos secos, usualmente liofilizados, en los que se incluyen excipientes que en la disolución proporcionarán una solución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

USOS TERAPÉUTICOS DE ANTICUERPOS ANTI-OX40

Se contempla que los anticuerpos de la presente invención pueden ser usados para tratar un mamífero. En una modalidad, el anticuerpo se administrado a un mamífero no humano por propósitos de obtener datos preclínicos, por ejemplo. Mamíferos no humanos ejemplares a ser tratados

incluyen primates no humanos, perros, gatos, roedores y otros mamíferos en los cuales se efectúan estudios preclínicos. Tales mamíferos pueden ser modelos de animales establecidos para una enfermedad a ser tratada con el anticuerpo o pueden ser usados para estudiar la toxicidad del anticuerpo de interés. En cada una de estas modalidades, se pueden efectuar estudios de escalamiento de dosis sobre el mamífero.

Un anticuerpo, con o sin una porción terapéutica conjugada al mismo, administrado solo o en combinación con factor(es) citotóxico(s) puede ser usado como un terapéutico. La presente invención es concerniente con terapias a base de anticuerpos que involucran la administración de anticuerpos de la invención a un animal, un mamífero o un humano para tratar una enfermedad, alteración o condición moderada por OX40. El animal o sujeto puede ser un animal en necesidad de un tratamiento particular, tal como un animal que ha sido diagnosticado con una alteración particular, por ejemplo uno concerniente con OX40. Los anticuerpos dirigidos contra OX40 son útiles contra alergia, asma, enfermedades autoinmunes e inflamatorias en animales, en los que se incluyen pero no limitados a vacas, puercos, caballos, pollos, gatos, perros, primates no humanos, etc., también como humanos. Por ejemplo, al administrar una dosis terapéuticamente aceptable de un anticuerpo o anticuerpos de la presente invención o un cocktail de los anticuerpos presentes o en combinación con otros anticuerpos de fuentes variables, los síntomas de la enfermedad autoinmune o inflamatoria pueden

ser reducidos o eliminados en el mamífero tratado.

Compuestos terapéuticos de la invención incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos de la invención (en los que se incluyen fragmentos, análogos y derivados de los mismos como se describe en la presente) y ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de la invención como se describen a continuación (en los que se incluyen fragmentos, análogos y derivados de los mismos y anticuerpos anti-idiotípicos como se describe en la presente). Los anticuerpos de la invención pueden ser usados para tratar, inhibir o impedir enfermedades, alteraciones o condiciones asociadas con la expresión aberrante y/o actividad de OX40, en las que se incluyen, pero no limitadas a, cualquiera de una o más de las enfermedades, alteraciones o condiciones descritas en la presente. El tratamiento y/o prevención de enfermedades, alteraciones o condiciones asociadas con la expresión aberrante y/o actividad de OX40 incluye pero no está limitado a, aliviar por lo menos síntomas asociados con aquéllas enfermedades, alteraciones o condiciones. Los anticuerpos de la invención pueden ser provistos en composiciones aceptables farmacéuticamente como es conocido en el arte o como se describe en la presente.

Los anticuerpos anti-OX40 de la presente invención pueden ser usados terapéuticamente en una variedad de enfermedades. La presente invención provee un método para prevenir o tratar enfermedades moderadas por OX40 en un mamífero. El método comprende administrar una cantidad que incluye o trata una enfermedad de anticuerpo anti-OX40 al mamífero. El anticuerpo anti-OX40 se enlaza a

OX40 y regula la expresión similar de citoquina y el receptor celular dando como resultado niveles de citoquina característicos de estado sin enfermedad. La señalización de OX40 ha sido enlazada a varias enfermedades tales como

5 alergia, asma y enfermedades asociadas con autoinmunidad e inflamación, en los que se incluyen esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de intestino inflamatorio, enfermedad de injerto contra huésped, encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) leishmaniasis experimental,

10 artritis colágeno-inducida, colitis (tal como colitis ulcerativa), reacciones de hipersensibilidad al contacto, diabetes, enfermedad de Crohn y enfermedad de Grave.

Los anticuerpos de la presente invención pueden también ser útiles para prevenir o tratar otras

15 enfermedades, en las que se incluyen sarcoidosis, enfermedades oculares autoinmunes, uveitis autoinmune, dermatitis atópica, miastenia grave, neuropatía autoinmune (tal como Guillain-Barré), ureitis autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, anemia perniciosa, trombocitopenia,

20 arteritis temporal, síndrome anti-fosfolípidos, vasculitis (tal como granulomatosis de Wegener), enfermedad de Behcet, psoriasis, dermatitis herpetiformes, pénfigo vulgaris, vitiligo, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune, tiroiditis Hashimoto, ooforitis y orquitis autoinmune,

25 enfermedad autoinmune de la glándula adrenal, lupus eritematoso sistémico, escleroderma, dermatomiositis, polimiositis, dermatomiositis, espondiloartropatías (tal como espondilitis anquilosante), Síndrome de Reiter, Síndrome de Sjogren y otros.

Un agente terapéutico para uso en un sujeto huésped produce preferiblemente pocas o ninguna respuesta inmunógena contra el agente en dicho sujeto. En una modalidad, la invención provee un agente. Por ejemplo, en una modalidad, la invención proporciona un anticuerpo humanizado que produce y/o se espera que produzca una respuesta de anticuerpo anti-ratón humana (HAMA) a un nivel sustancialmente reducido en comparación con un anticuerpo que comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera en un sujeto huésped. En otro ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo humanizado que produce y/o se espera que produzca mínima o ninguna respuesta de anticuerpo anti-ratón humana (HAMA). En un ejemplo, un anticuerpo de la invención produce respuesta anti-ratón que está en o menos de un nivel aceptable clínicamente.

La cantidad del anticuerpo que será efectiva en el tratamiento, inhibición o prevención de una enfermedad o alteración asociada con la expresión aberrante y/o actividad de OX40 puede ser determinada mediante técnicas clínicas estándar. La dosificación, dependerá del tipo de enfermedad a ser tratada, la severidad y curso de la enfermedad, si el anticuerpo es suministrado por propósitos preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia y respuesta clínica del paciente al anticuerpo y la discreción del médico que atiende. El anticuerpo puede ser administrado en regímenes de tratamiento consistentes con la enfermedad, por ejemplo, una sola dosis o menos dosis de uno a varios días para mejorar un estado de enfermedad o dosis periódicas en un tiempo prolongado para impedir

alergia o asma. Además, análisis in vitro pueden ser usados
opcionalmente para ayudar a identificar intervalos de
dosificación óptimos. La dosis precisa a ser empleada en la
formulación también dependerá de la ruta de administración
5 y la seriedad de la enfermedad o alteración y debe ser
decidida de acuerdo con el juicio del médico y cada
circunstancia del paciente. Las dosis efectivas pueden ser
extrapoladas de curvas de respuesta a la dosis derivadas de
sistemas de prueba in vitro o sistemas de pruebas en
10 modelos de animales.

Para anticuerpos, la dosificación administrada a
un paciente es comúnmente de 0.1 mg/Kg a 150 mg/Kg del peso
corporal del paciente. Preferiblemente, la dosificación
administrada a un paciente es de entre 0.1 mg/Kg a 20 mg/Kg
15 del peso corporal del paciente, más preferiblemente 1 mg/Kg
a 10 mg/Kg del peso corporal del paciente. En general, los
anticuerpos humanos tienen una vida media más larga en el
cuerpo humano que los anticuerpos de otra especie debido a
respuesta inmune a los polipéptidos extraños. Así,
20 dosificaciones más bajas de anticuerpos humanos y la
administración menos frecuente es frecuentemente posible.
Además, la dosificación y frecuencia de administración de
anticuerpos de la invención pueden ser reducidas al mejorar
la absorción y penetración de tejido (por ejemplo, al
25 cerebro) de los anticuerpos mediante notificaciones tales
como, por ejemplo lipídación. Para administraciones
repetidas en varios días o más, dependiendo de la
condición, el tratamiento es sostenido hasta que se
presenta una supresión deseada de síntomas de la

121

enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El avance de esta terapia es monitoreado fácilmente mediante técnicas y análisis convencionales. Un régimen de dosificación ejemplar para un anticuerpo anti-LFA-1 o anti-ICAM-1 es revelado en WO 94/04188.

Los anticuerpos de la presente invención, que pueden estar en forma de una composición, deben ser formulados, dosificados y administrados de manera consistente con la buena práctica médica. Factores para consideración en este contexto incluyen la alteración particular que es tratada, el mamífero particular que es tratado, la condición clínica del paciente individual, la causa de la alteración, el sitio de administración del agente, el método de administración, el horario de administración y otros factores conocidos para los médicos experimentados. La "cantidad terapéuticamente efectiva" de la composición de anticuerpo a ser administrada será determinada por consideraciones tales como la cantidad mínima necesaria para impedir, mejorar o tratar una enfermedad o alteración. El anticuerpo no necesita ser pero es formulado opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para impedir o tratar la alteración en cuestión. La cantidad efectiva de tales otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de alteración o tratamiento y otros factores discutidos anteriormente. Estos son en general usados en las mismas dosificaciones y con rutas de administración como se usan anteriormente en la presente o alrededor de 1 a 99% de las dosificaciones hasta ahora

empleadas.

Los anticuerpos de esta invención pueden ser utilizados ventajosamente en combinación con otros anticuerpos monoclonales o quiméricos o con limpocinas o factores de crecimiento hematopoyético (tales como, por ejemplo, IL-2, IL-3, IL-7 e IFN- γ), por ejemplo, que sirven para incrementar el número o actividad de células efectoras que interactúan con los anticuerpos.

Los anticuerpos de la invención pueden ser administrados solos o en combinación con otros tipos de tratamientos, tales como terapias anti-inflamatorias, fármacos inmunosupresores, inmunoterapias, quimioterapias, broncodilatores, moléculas anti-IgE, anti-histamínicos o anti-leucotrienos.

En un aspecto preferido, el anticuerpo está sustancialmente purificado (por ejemplo, sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios indeseables). Varios sistemas de administración son conocidos y pueden ser usados para administrar un anticuerpo de la presente invención, en los que se incluyen inyección, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis receptor-moderada (véase, por ejemplo, Wu, et al., J Biol Chem 262:4429 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc.

El anticuerpo anti-OX40 puede ser administrado al mamífero de cualquier manera aceptable. Métodos de introducción incluyen pero no están limitados a rutas

13

parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal, epidural, inhalación y rutas orales y si se desea para tratamiento inmunosupresor administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen

5 administración intramuscular, intradérmico, intravenoso, intraarterial o intraperitoneal. Los anticuerpos o composiciones pueden ser administrados mediante cualquier ruta conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección de bolo, mediante absorción por medio de

10 revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden ser administrados junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los anticuerpos

15 terapéuticos o composiciones de la invención al sistema nervioso central mediante cualquier ruta apropiada, en las que se incluyen inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede ser facilitada por un catéter intraventricular, por ejemplo, anexo a un

20 depósito tal como un depósito de Ommaya. Además, el anticuerpo es administrado apropiadamente mediante infusión pulsada, particularmente con dosis declinantes del anticuerpo. Preferiblemente la dosificación es dada por inyecciones, más preferiblemente inyecciones intravenosas o

25 subcutáneas, dependiendo en parte si la administración es breve o crónica.

La administración pulmonar puede también ser empleada, por ejemplo mediante el uso de un inhalador o nebulizador y formulación con un agente de aerosol. El

anticuerpo puede también ser administrado a los pulmones de un paciente en forma de una composición en polvo seca (véase, por ejemplo Patente Estadounidense 6,514,496).

En una modalidad específica, puede ser deseable
5 administrar los anticuerpos terapéuticos o composiciones de la invención localmente al área en necesidad de tratamiento; esto puede ser obtenido por ejemplo, a manera de ejemplo y no de limitación, infusión local, aplicación tópica, mediante inyección, por medio de un catéter, por
10 medio de un supositorio o por medio de un implante, dicho implante siendo un material poroso, no poroso o gelatinoso, en los que se incluyen membranas, tales como membranas sialásticas o fibras. Preferiblemente, cuando se administra un anticuerpo de la invención, se debe tener cuidado de
15 usar materiales a los cuales la proteína no se absorbe.

En otra modalidad, el anticuerpo puede ser administrado en un vesículo, en particular un liposoma (véase Langer, *Science* 249:1527 (1990); Treat, *et al.*, in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*,
20 Lopez-Berestein, *et al.*, eds., pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-27; see generally *ibid.*).

En todavía otra modalidad, el anticuerpo puede ser administrado en un sistema de liberación controlada. En una modalidad, se puede usar una bomba (véase Langer, *Science* 249:1527 (1990); Sefton, *CRC Crit Ref Biomed Eng*
25 14:201 (1987); Buchwald, *et al.*, *Surgery* 88:507 (1980); Saudek, *et al.*, *N Engl J Med* 321:574 (1989)). En otra modalidad, se pueden usar materiales poliméricos (véase *Medical Applications of Controlled Release*, Langer, *et al.*,

eds., CRC Press (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen, et al., eds., Wiley (1984); Ranger, et al., *J Macromol Sci Rev Macromol Chem* 23:61 (1983); véase también Levy, et al., *Science* 5 228:190 (1985); During, et al., *Ann Neurol* 25:351 (1989); Howard, et al., *J Neurosurg* 71:105 (1989)). En todavía otra modalidad, un sistema de liberación controlada puede ser colocado en proximidad del objetivo terapéutico.

La presente invención proporciona también
10 composiciones farmacéuticas. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de anticuerpo y un portador aceptable fisiológicamente. En una modalidad específica, el término "aceptable fisiológicamente" significa aprobado por una agencia regulatoria del Gobierno
15 Federal o Estatal o enlistado en la farmacopea de los Estados Unidos de América u otra farmacopea reconocida en general para uso en animales y más en particular en humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual el terapéutico
20 es administrado. Tales portadores fisiológicos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceite, en los que se incluyen aquéllos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soya, aceite mineral, aceite de sésamo y los semejantes. El agua
25 es un portador preferido cuando la composición farmacéutica es administrada intravenosamente. Soluciones salinas y soluciones de dextrosa y glicerol acuosas pueden también ser empleadas como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos

126

apropiados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, esterato de sodio, monoesterato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada seca, glicerol, propilenglicol, 5 agua, etanol y los semejantes. La composición puede contener, si se desea, cantidades menores de aceites humectantes o emulsificantes o agentes reguladores del PH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, tabletas, píldoras, cápsulas, 10 polvos, formulaciones de liberación sostenida y los semejantes. La composición puede ser formulada como supositorios, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar tales como grados farmacéuticos de 15 manitol, lactosa, almidón, esterato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de portadores apropiados son descritos en "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad efectiva del 20 anticuerpo, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad apropiada de portador para proveer la forma para administración apropiada al paciente. La formulación se debe adaptar al modo de administración.

En una modalidad, la composición es formulada de 25 acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Comúnmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en solución reguladora del PH acuosa isotónica estéril. En donde sea

127

necesario, la composición puede también incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de inyección. En general, los ingredientes son suministrados ya sea separadamente o
5 mezclados conjuntamente en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolleta o saco que indica la cantidad de agente activo. En donde la composición va a ser administrada
10 mediante infusión, puede ser surtida con una botella de infusión que contiene agua grado farmacéutico estéril o solución salina. En donde la composición es administrada mediante inyección, una ampolleta de agua para inyección o solución salina puede ser provista, de tal manera que los
15 ingredientes pueden ser mezclados antes de la administración.

La invención también proporciona un paquete farmacéutico o kit que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las
20 composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociada con tal(es) recipiente(s) puede estar una notificación en forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la manufactura, uso o venta de farmacéuticos o productos biológicos, tal notificación
25 refleja la aprobación por la agencia de la manufactura, uso o venta para administración humana.

Además, los anticuerpos de la presente invención pueden ser conjugados a varias moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionucleótidos o

toxinas. Véanse, por ejemplo, publicaciones de PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; Patente Estadounidense 5,314,995 y EP 396,387. Un anticuerpo o fragmento del mismo puede ser conjugado a una porción terapéutica tal como una

5 citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un ion de metal radioactivo (por ejemplo, emisores alfa tales como ^{213}Bi). Un agente de citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Ejemplos incluyen

10 paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidium, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona,

15 glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina y análogos y homólogos de los mismos. Agentes terapéuticos incluyen, pero no están limitados a antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil

20 decarbacina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalana, carmustina, (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamin platino (II) (DDP) (cisplatina),

25 antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes anti-mitóticos (por ejemplo vincristina y vinblastina).

Técnicas para conjugar tal porción terapéutica a anticuerpos son bien conocidas, véase por ejemplo, Arnon, *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargetin Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld, *et al.* (eds.), pp. 243-56 Alan R. Liss (1985); Hellstrom, *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug -Delivery*, 2nd ed., Robinson, *et al.*, pp. 623-53, Marcel -Dekker (1987); Thorpe, "Antibodie Carries Of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review, "in *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, "in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy*, Baldwin, *et al.*, ed., pp. 303-16, Academic Press (1985); and Thorpe, *et al.*, *Immunol Rev* 62:119 (1982). Alternativamente, un anticuerpo puede ser conjugado a un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo. Véase, por ejemplo Patente Estadounidense 4,676,980.

Los conjugados de la invención pueden ser usados para modificar una respuesta biológica dada, el agente terapéutico o porción de fármaco no será interpretado como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la porción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de difteria; una proteína tal como factor de necrosis de

tumor, interferón α , interferón β , factor de crecimiento de nervios, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador de plasminógeno de tejido, un agente apoptótico, por ejemplo, TNF- α , TNF- β , AIM I (véase, publicación internacional No. WO 97/33899), AIM II (véase, publicación internacional No. WO 97/34911), ligando Fas (Takahashi, et al., *Int Immunol*, 6:1567 (1994)), VEGI (véase, publicación internacional No. WO 99/23105); un agente trombótico; un agente anti-angiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina; 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 colonia de macrófago de granulocito ("GM-CSF"), factor estimulador de colonia granulocito ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

TERAPIA GENÉTICA A BASE DE ANTICUERPO

En otro aspecto de la invención, ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican anticuerpos o derivados funcionales de los mismos, son administrados para tratar, inhibir o impedir una enfermedad o alteración asociada con la expresión aberrante y/o actividad de OX40, por medio de terapia genética. Terapia genética se refiere a terapia efectuada por la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta modalidad de la invención, los ácidos nucleicos producen su proteína codificada que modera un efecto terapéutico. Cualquiera de los métodos de terapia genética disponibles pueden ser usados de acuerdo con la presente invención. Métodos

ejemplares son descritos posteriormente en la presente.

Para revisiones generales de los métodos de terapia genética, véase Goldspiel, et al., *Clinical Pharmacy* 12:488 (1993); Wu, et al., *Biotherapy* 3:87 (1991);
5 Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 32:573 (1993); Mulligan, *Science* 260:926 (1993); Morgan, et al., *Ann Rev Biochem* 62:191 (1993); mayo, *TIBTECH* 11:155 (1993).

En un aspecto, el compuesto comprende secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo, la secuencia
10 de ácidos nucleicos son parte de vectores de expresión que expresan el anticuerpo o fragmentos o proteínas quiméricas o cadenas pesadas o ligeras de los mismos en un huésped apropiado. En particular, tales secuencias de ácido nucleico tienen promotores enlazados operativamente a la
15 región de codificación de anticuerpo, el promotor es inducible o constitutivo y opcionalmente específico de tejido.

En otra modalidad particular, se usan moléculas de ácido nucleico en las cuales las secuencias de
20 codificación de anticuerpo y cualesquier otras secuencias deseadas son flanqueadas por regiones que promueven recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión intracromosomal de los ácidos nucleicos que codifican anticuerpo (Koller, et al.,
25 *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8932 (1989); Zijlstra, et al., *Nature* 342:435 (1989)). En modalidades específicas, la molécula de anticuerpo expresada es un anticuerpo de una sola cadena; alternativamente, las secuencias de ácidos nucleicos incluyen secuencias que codifican tanto las

122

cadenas pesadas como ligeras o fragmentos de las mismas del anticuerpo.

La administración de los ácidos nucleicos a un paciente puede ser ya sea directa, en cuyo caso, el
5 paciente es expuesto directamente al ácido nucleico o vectores portadores de ácido nucleico o indirecta, en cuyo caso, las células son primero transformadas con los ácidos nucleicos in vitro, luego trasplantadas al paciente. Estos dos procedimientos son conocidos, respectivamente, como
10 terapia genética *in vivo* o *ex vivo*.

En una modalidad específica, las secuencias de ácidos nucleicos son administradas directamente *in vivo*, en donde es expresada para producir el producto codificado. Esto se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los
15 numerosos métodos conocidos en el arte, por ejemplo, al construirlos como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrarlo de tal manera que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante infección utilizando retrovirales defectuosos o atenuados u otros
20 vectores virales (véase patente estadounidense No. 4,980,286) o mediante inyección directa de ADN desnudo o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola genética; Biolistic, Dupont) o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie
25 celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas o al administrarlos en enlace a un péptido que se sabe que entra al núcleo, al administrarlo en enlace a un ligando sujeto a endocitosis moderada por receptor (véase, por ejemplo, Wu,

et al., *J Biol Chem* 262:4429 (1987)) (que puede ser usado para apuntar tipos de células que expresan específicamente los receptores), etc. En otra modalidad, los complejos de ácido nucleico-ligando pueden ser formados en los cuales el
5 ligando comprende un péptido viral fusogénico para someter a disrupción endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite degradación lisosomal. En todavía otra modalidad, el ácido nucleico puede ser apuntado *in vivo* para la absorción específica de célula y expresión, mediante apuntamiento de
10 un receptor específico (véase, por ejemplo, publicaciones de PCT WO 92/06180; WO 92/22635; WO92/20316; WO93/14188, WO 93/20221). Alternativamente, el ácido nucleico puede ser introducido intracelularmente e incorporado dentro del ADN de célula huésped para expresión, mediante recombinación
15 homóloga (Koller, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8932 (1989); Zijlstra, *et al.*, *Nature* 342:435 (1989)).

En una modalidad específica, se usan vectores virales que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, se
20 puede usar un vector retroviral (véase Miller, *et al.*, *Meth Enzymol* 217:581 (1993)). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el empaque correcto del genoma viral e integración al ADN de célula huésped. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican
25 el anticuerpo a ser usado en terapia genética son clonadas a uno o más vectores, lo que facilita la administración del gen a un paciente. Más detalle acerca de vectores retrovirales se puede encontrar en Boesen, *et al.*, *Biotherapy* 6:291 (1994) que describe el uso de un vector

129

retroviral para administrar el gen de mdrl a las células de tallo hematopoyéticas con el fin de hacer a las células de tallo más resistentes a quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia genética son: Clowes, et al., *J Clin Invest* 93:644 (1994); Kiem, et al., *Blood* 83:1467 (1994); Salmons, et al., *Human Gene Therapy* 4:129 (1993); y Grossman, et al., *Curr Opin Gen y Dev* 3:110 (1993).

Adenovirus pueden también ser usados en la presente invención. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos en la presente invención para administrar anticuerpos a epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan naturalmente los epitelios respiratorios. Otros objetivos para sistemas de administración a base de adenovirus son hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales y músculos. Los adenovirus tienen la ventaja de ser aptos de infectar células que no se dividen. Kozarsky, et al., *Curr Opin Gen Dev* 3:499 (1993) presentan una revisión de terapia genética a base de adenovirus. Bout, et al., *Human Gene Therapy* 5:3 (1994) demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes a los epitelios respiratorios de monos rhesus. Otras instancias del uso de adenovirus en terapia genética se pueden encontrar en Rosenfeld, et al., *Science* 252:431 (1991); Rosenfeld, et al., *Cell* 68:143 (1992); Mastrangeli, et al., *J Clin Invest* 91:225 (1993); publicación de PCT WO94/12649; Wang, et al., *Gene Therapy* 2:775 (1995). El virus adeno-asociado (AAV) también ha sido propuesto para uso en terapia genética (Walsh, et al., *Proc*

13-

Soc Exp Biol Med 204:289 (1993); patentes estadounidenses Nos. 5,436,146; 6,632,670; y 6,642,051).

Otro procedimiento a terapia genética involucra transferir un gen a las células en cultivo de tejido
5 mediante métodos tales como electroporación, lipofección, transfección moderada por fosfato de calcio o infección viral. Usualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Luego las células son colocadas bajo selección para aislar
10 aquellas células que han absorbido y están expresando el gen transferido. Aquellas células son luego administradas a un paciente.

En esta modalidad, el ácido nucleico es introducido a una célula antes de la administración *in vivo*
15 de la célula recombinante resultante. Tal introducción se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido en el arte, en los que se incluyen pero no limitados a transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago que contiene las
20 secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia genética moderada por cromosoma, transferencia genética moderada por microcélula, fusión de esferoplasto, etc. Numerosas técnicas son conocidas en el arte para la introducción de genes extraños a células (véase, por
25 ejemplo, Loeffler, et al., *Meth Enzymol* 217:599 (1993); Cohen, et al., *Meth Enzymol* 217:618 (1993); Cline, *Pharmac Ther* 29:69 (1985)) y pueden ser usadas de acuerdo con la presente invención, a condición de que las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células

128

receptoras no sean sometidas a disrupción. La técnica debe proveer la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de tal manera que el ácido nucleico es expresable por la célula y preferiblemente heredable y expresable por su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes pueden ser administradas a un paciente mediante varios métodos conocidos en el arte. Células de sangre recombinantes (por ejemplo, células de tallo hematopoyéticas o células progenitoras) son preferiblemente administradas intravenosamente. La cantidad de células contempladas para uso depende del efecto deseado, estado del paciente, etc. y puede ser determinada por aquel experimentado en el arte.

Las células a las cuales un ácido nucleico puede ser introducido por propósitos de terapia genética abarca cualquier tipo de célula deseable disponible e incluye pero no están limitadas a células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células de músculo, hepatocitos; células de sangre tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; varias células de tallo o progenitoras, en particular células de tallo hematopoyéticas o células progenitoras, por ejemplo, tal como son obtenidas de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

En una modalidad, la célula usada para terapia genética es autóloga al paciente. Secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de la presente invención son introducidas a las células, de tal manera que

son expresables por las células o su progenie y las células recombinantes son luego administradas *in vivo* para el efecto terapéutico. En una modalidad específica, se usan células de tallo o células progenitoras. Cualesquier
5 células de tallo y/o progenitoras que pueden ser aisladas y mantenidas *in vitro* pueden potencialmente ser usadas de acuerdo con esta modalidad de la presente invención (véase por ejemplo publicación de PCT WO 94/08598; Stemple, et al., *Cell* 71:973 (1992); Rheinwald, *Meth Cell Bio* 21A:229
10 (1980); Pittelkow, et al., *Mayo Clinic Proc* 61 :771 (1986)).

EJEMPLOS

15 La presente invención puede ser ilustrada adicionalmente por los siguientes ejemplos de modalidades preferidas de la misma, aunque se comprenderá que estos ejemplos son incluidos solamente por propósitos de ilustración y no pretende limitar el alcance de la
20 invención a no ser que se indique de otra manera específicamente.

EJEMPLO 1: PREPARACIÓN DE UN OX40/FC INMUNÓGENO HUMANO

Dos formas del receptor de OX40 fueron usadas
25 como inmunógenos para generar anticuerpos anti-OX40 antagonistas de la presente invención. La primera fue la forma soluble del receptor de OX40 humano expresado como proteína de fusión que comprende Fcγ1 humano y el dominio extracelular codificado por los residuos de nucleótidos 105

a 627 de SEQ ID NO: 1. La segunda forma fue un inmunógeno a base de célula que comprende el OX40 de plena longitud expresado sobre la superficie de células L de fibroblasto de ratón transfectadas establemente.

5 La forma soluble de OX40 fue clonada de un clon de cADN de OX40 aislado de células T CD4 humanas TCR-activadas. Los dos cebadores usados para generar el clon de cADN de OX40 fueron: (1) un cebador de sentido que tiene la secuencia de nucleótidos cccaagctttaccccagcaacgaccggtgctgc
10 (SEQ ID NO: 3) que contiene un sitio HindIII y (2) un cebador antisentido que tiene la secuencia de nucleótidos cgcctcgaggacctccacgggccgggtgg (SEQ ID NO: 4) que contiene un sitio XhoI en cuadro con Fcγ1 humano. El fragmento de PCR de 540 bp resultante fue subclonado a un vector
15 disponible comercialmente que contenía una secuencia de péptido de señal de secreción en el extremo 5' y una secuencia de Fcγ1 humana (regiones de articulación o engozne y regiones constantes CH2 y CH3) a el extremo 3'. La composición de los constructos fue confirmada mediante
20 secuenciación.

 Para la expresión transitoria, el ADN de OX40/Fcγ1 fue transfectado a células 293T (Invitrogen, Carlsbad, CA) mediante Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. A
25 las 72 horas post-transfección, los sobrenadantes de cultivo de las células transfectadas fueron recolectados para la purificación. La expresión estable de OX40/Fcγ1 fue también establecida en una línea de célula 293T. Para confirmar la expresión, los sobrenadantes de cultivo fueron

analizados mediante electroforesis de gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Las proteínas separadas fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa y detectadas con anticuerpo monoclonal IgG anti-humano (Fc) de ratón peroxidasa de rábano (HRP) conjugado (Sigma, St. Louis, MO) o anticuerpos anti-OX40 de cabra policlonales (R&D Systems, Minneapolis, MN) detectados con IgG anti-cabra de HRP-burro (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Las proteínas inmunoreactivas fueron identificadas sobre película utilizando detección de quimio-luminiscencia mejorada (Pierce, Rockford, IL). El OX40/Fcγ1 fue purificado con una columna de afinidad de proteína-A (Invitrogen, Carlsbad, CA) equilibrada en solución salina de pH regulado de fosfato (PBS). Después de aplicar el sobrenadante de cultivo celular a la columna, la resina fue lavada con aproximadamente 20 volúmenes de columna de PBS seguido por un lavado con solución reguladora del pH de SCC (citrato de sodio 0.05 M, cloruro de sodio 0.5 M, pH 6.0) para remover las proteínas sin enlazar. Las proteínas de fusión OX40 fueron eluidas utilizando citrato de sodio 0.05 M, cloruro de sodio 0.15 M (pH 3.0) seguido por diálisis en PBS (pH 7.0). Las fracciones de la columna de afinidad que contienen OX40/Fcγ1 fueron analizadas mediante SDS-PAGE. La pureza de las proteínas fue analizada mediante teñido de azul de Coomassie y la identidad de las proteínas mediante inmunoabsorción de Western utilizando anticuerpo IgG (Fc) anti-humano de cabra (Sigma, St. Louis, MO) y anticuerpo OX40 anti-humano de cabra (R&D Systems, Minneapolis, MN)

como se describe anteriormente.

La segunda forma de inmunógeno fue construida utilizando cADN OX40 humano de plena longitud que fue clonado de células T CD4 humanas TCR-activadas. Los dos
5 cebadores usados fueron cebadores OX40-específicos que tienen la secuencia de nucleótidos caccatgtgcgtgggggctcggcggctggg (SEQ ID NO: 5) y gatcttggccagggtggagtgggcgctcgcc (SEQ ID NO: 6). El producto de PCR resultante fue clonado directamente a un vector
10 disponible comercialmente y transfectado establemente a fibroblastos L de ratón para la expresión de alto nivel de OX40. Antes de la administración, las células L de inmunógeno a base de célula fueron irradiadas con 6800 Grays utilizando un dispositivo GammaCell 1000 Elite modelo
15 A (MDS Nordion, Ottawa Canadá) para inhibir la proliferación del inmunógeno.

EJEMPLO 2: GENERACIÓN DE MAB ANTI-OX40

Aproximadamente 20 µg del inmunógeno OX40/Fcγ1
20 soluble fueron combinados con adyuvante de Freund (1:1) y administrados a dos ratones A/J de seis semanas de edad (Harlan, Houston, Tex.) en tres inyecciones subcutáneas seguidas por una inyección intraperitoneal (sin adyuvante) a intervalos de 7 días. Tres días después de la inyección
25 final, los esplenocitos de los ratones inmunizados fueron fusionados con células de SP2/0 de mieloma murino de acuerdo con el método de Groth y Scheidegger (*J Immunol Methods*, 1980) como se describe posteriormente en la presente.

Para el inmunógeno a base de célula, 3×10^6 células L transfectadas establemente de OX40 gamma-irradiadas fueron administradas a ratones A/J de seis semanas de edad (Harlan, Houston, Tex.) mediante tres
5 inyecciones subcutáneas en PBS seguida por una inyección intraperitoneal a intervalos de 7 días. Tres días después de la inyección final, los esplenocitos de ratones inmunizados fueron fusionados con células de SP2/0 de mieloma murino como se describe posteriormente en la
10 presente.

En la fusión que conduce a la generación de mAb anti-OX40, suspensiones unicelulares fueron preparadas a partir de los bazos de ratones inmunizados y usados para fusión con células de mieloma de Sp2/0 inmortalizadas (a
15 una proporción de 1:1) utilizando un agente de fusión apropiado, polietilenglicol (M. W. 1450) (Kodak, Rochester, NY) y dimetil sulfóxido al 5% sulfóxido de dimetilo (Sigma, St Louis, MO) para formar células de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic
20 Press, pp.59-103 (1986). Después de 10 días, las líneas celulares de hibridoma fueron cultivadas en un medio completo de cultivo de DMEM apropiado (Invitrogen, Carlsbad, CA), que contenía preferiblemente hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), una sustancia que inhibe el
25 crecimiento o supervivencia de células inmortalizadas sin fusionar. De 2 experimentos de fusión 24,000 líneas celulares inmortalizadas preferidas fueron obtenidas que se fusionaban eficientemente, soportaba la producción a alto nivel estable de anticuerpo y eran sensibles al medio de

HAT.

EJEMPLO 3: SELECCIÓN EN CUANTO A ANTICUERPOS ANTI-OX-40

ANTAGONISTAS

5 El medio de cultivo en el cual las células de
hibridoma fueron cultivadas fue analizado en cuanto a la
producción de anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos
contra OX40. La especificidad de enlace de mAb producidos
por las células de hibridoma fue determinada mediante tres
10 procedimientos diferentes: FMAT, ELISA e inmunoanálisis de
citometría de flujo.

A. Selección de FMAT

Utilizando el procedimiento de FMAT, se
15 identificaron 220 líneas celulares de hibridoma que
segregan mAb OX40 anti-humano de ratón por su fuerte
reactividad con células L OX40-transfectadas
transitoriamente, pero no con células L sin transfectar
falsas. Los sobrenadantes de hibridoma anti-OX40 fueron
20 seleccionados utilizando FMAT que emplea una plataforma de
barrido macroconfocal para formación de imagen y
cuantificar tanto el número de células como fluorescencia
en un formato de placa de microtitulo de 96 cavidades.
Células L que expresa antígeno OX40 fueron incubadas con 5
25 µl de sobrenadante de hibridoma anti-OX40 y marcadas
fluorescentemente con anticuerpos IgG-Fcγ anti-ratón de
cabra Cy-5-conjugados (Jackson Laboratories, PA) que fueron
diluidos a 0.125 µg/ml en solución reguladora del pH de
selección. Las placas fueron exploradas después de 2 horas

de incubación utilizando un sistema FMAT 8100 HTS (Applied Biosystem, CA). Los resultados en la Tabla 1 muestran que los clones B24 y B39 tienen actividad comparable con el control positivo.

5

B. Selección mediante ELISA

Placas de 96 cavidades de cloruro de polivinilo (Nunc, Roskilde, Dinamarca) fueron recubiertas durante toda la noche a 4°C con OX40/Fcγ1 (5 ng/cavidad) o con Fcγ1 humano (25 ng/cavidad) como un testigo de selección, seguido por una incubación de una hora con BSA al 2% en PBS para bloquear el enlace no específico. Aproximadamente 50 μl de sobrenadante de hibridoma fueron agregados e incubados por 1 hora. Después de cuatro lavados con TWEEN®-
10 PBS al 0.05%, se agregaron aproximadamente 0.2 μg de Fcγ IgG anti-ratón HRP-cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA) durante 1 hora a temperatura ambiente para detectar la presencia de anticuerpo anti-OX40 enlazado. Se agregaron 100 μl de TMB 1 mM (Sigma) solución
15 de sustrato recién elaborada a cada cavidad durante 30 minutos y la reacción fue detenida al agregar 50 ml de H₂SO₄ 0.2 M y las placas fueron leídas a 450 nm utilizando un lector de microplacas (Molecular Devices, CA). De 24,000 cavidades, 220 fueron consideradas positivas mediante FMAT
20 y ELISA. Los datos representativos son reportados en la Tabla 1.

TABLA 1

	FLI (Fluorescencia media)	Num de Células Fluorescentes	OD ₄₅₀
Clon #B24	5560	39	3.4
Clon #B39	7665.3	44	3.6
Testigo negativo	0	0	NA
Testigo positivo	5028.5	41	NA

C. Selección mediante Citometría de Flujo

Los 220 hibridomas positivos seleccionados mediante FMAT y ELISA fueron también probados mediante citometría de flujo utilizando células L OX40 transfectadas establemente que fueron teñidas utilizando 5 µl de sobrenadantes de hibridoma anti-OX40 y marcados fluorescentemente mediante anticuerpo IgG-Fcy anti-ratón de cabra FITC-conjugado (Jackson Laboratories, PA). Los datos presentados en la Tabla 2 corresponden al porcentaje de células L OX40-transfectadas totales teñidas utilizando sobrenadante de hibridoma anti-OX40.

TABLA 2

	Clon #B2 % de Células Fluorescentes	Clon #B17 % de Células Fluorescentes	Clon #B36 % de Células Fluorescentes	Clon #B37 % de Células Fluorescentes
Células L	0.82	0.7	0.9	0.4
Células L OX40L	30.4	0.3	15.0	32.7

De los 220 mAb anti-OX40 identificados en las Tablas 1 y 2, los clones de mAb anti-OX40 B2, B24, B36, B37 y B39 mostraron enlace positivo a células L OX40L pero no a las células L sin transfectar. B-17 fue rechazado debido a que no muestra enlace a células L OX40L.

15)

EJEMPLO 4: CARACTERIZACIÓN INICIAL DE mAb ANTI-OX40**ANTAGONISTAS**

Después de identificar los 220 hibridomas que
5 producen anticuerpos específicos a OX40 humano, los clones
fueron subclonados mediante procedimientos de dilución
limitante y cultivos mediante métodos estándar (Goding,
Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic
Press, pp. 59-103 (1986)). Los 220 mAb anti-OX40 secretados
10 por los sub-clones fueron purificados del medio de cultivo
mediante procedimientos de purificación convencionales
utilizando proteína A-Sefarosa.

A. Preparación de Línea Celular

15 La influencia de la co-estimulación de OX40 sobre
el desarrollo de célula T CD4+ humana fue examinada
utilizando líneas celulares específicas y células T CD4+
naturales humanas aisladas recientes para caracterizar los
220 aglutinantes de mAb anti-OX40. Estas líneas celulares
20 incluían: (1) línea de célula T CD4+ leucémica Hut-78
humana OX40 transfectada, (2) células L de ratón de
fibroblasto L OX40L-transfectadas y sus líneas celulares
padre (provistas por Dr. Yong-Jun Liu, M. D. Anderson
Cancer Center, Houston, TX), (3) células T CD4+ naturales
25 humanas y (4) células dendríticas humanas (DC) cultivadas
en presencia de IL-4 humano y GM-CSF y diferenciadas a
partir de monocitos CD 14+ aislados. La fracción de
cubierta amarilla de sangre recolectada de individuos
adultos saludables sirvió como fuente de células T

naturales humanas aisladas mediante agotamiento magnético (fenotipo CD4+, CD45RA+, CD45RO- y CD 14-); como una fuente de células dendríticas CD1 Ic⁺ (CD) aisladas mediante clasificación celular o como fuente de monocitos CD 14+ 5 aislados que fueron diferenciados en CD inmaduras.

B. Análisis Funcionales

1. Análisis Hut-78

Células T de CD4+ leucémicas Hut-78 humanas OX40 10 transfectadas fueron cebadas durante 48 horas en placas de 96 cavidades con 5 µg/ml de anti-CD3 (OKT3, BD Biosciences, CA) y 1 µg/ml de mAb anti-CD28 (CD28.2, BD Biosciences, CA) en presencia de células OX40L L-transfectadas (6800 cGray) irradiadas o células L sin transfectar a una proporción de 15 4:1 (células OX40-Hut78/células L). Los 220 mAb anti-OX40 identificados en el Ejemplo 3 fueron agregados al comienzo del análisis para seleccionar la actividad antagonista definida como inhibición de liberación de citocina de célula T CD4+. El análisis fue repetido tres veces 20 utilizando el mismo protocolo. El experimento resumido en la Tabla 3 es un ejemplo de tres mAb anti-OX40 representativos (B66, B76 y B86) y demostró que las células T activadas en presencia de células OX40L transfectadas producen por lo menos 10 veces más IL-2 (138 pg/ml) e IL-13 25 (620 pg/ml) que aquellas activadas en presencia de células L sin transfectar (22 pg/ml para IL-2 y 70 pg/ml para producción de IL-13). La adición de mAb anti-OX40 purificados B66 y B76 al cultivo celular bloqueó la producción de citocina de línea celular T CD4⁺ de manera

137

sensible a la dosis. El clon B66 inhibió el 88% de IL-2 y 92% de producción de citocina IL-13 a la concentración más alta (Tabla 3). De los 220 mAb anti-OX40 probados, 10 clones que muestran más del 60% inhibición de producción de citocina IL-2 e IL-13 fueron seleccionados (datos no mostrados).

Tabla 3

Producción de Citocina	OX40 Hut-78+	OX40 Hut78+ + Células L.	OX40-Hut-78+ + OX40L-células L+													
			IC (n:3)		B66 (n:3)				B76 (n:3)				B86 (n:3)			
AbConc(µg/ml)			0	20	0	1	5	20	0	1	5	20	0	1	5	20
IL2 (pg/ml) ± SD	22	0	138	148	138	61	27	15	138	69	21	12	138	161	135	152
	8.7	5.2	13.9	13.5	13.9	1.1	3	5.7	13.9	10.1	8.6	9.3	13.9	15	6.3	26.8
IL13 (pg/ml)± SD	70	0	620	712	620	139	95	41	620	316	234	223	620	623	616	645
	0	18.7	49.5	64.7	49.5	33.3	21.1	23.6	49.5	11.3	25.1	46.2	49.5	22.8	27.9	17.1

C. Análisis de Célula T CD4+ Natural

Con el fin de bloquear la co-estimulación de OX40 de proliferación de célula T y producción de citocina, los 220 mAb anti-OX40 fueron seleccionados funcionalmente en cuanto a su habilidad para inhibir la producción de citocina, proliferación y para inducir la apoptosis en células T CD4+ humanas. Células T CD4+ humanas naturales fueron aisladas de la cubierta amarilla de sangre humano de voluntarios adultos saludables (Gulf Coast Regional Blood Center, Houston, TX) utilizando un kit de aislamiento de célula T CD4+ natural disponible comercialmente (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Las células T CD4+ humanas naturales aisladas fueron activadas con 5 µg/ml de anti-CD3 (OKT3, BD Biosciences, CA) y 1 µg/ml de mAb anti-CD28 (CD28.2, BD Biosciences, CA) en presencia de células L OX40L-

transfectadas irradiadas o células L padres a una proporción de 1:4 (células L/células T CD4⁺ naturales). Después de siete días de cultivo, las células T CD4⁺ naturales activadas en presencia de transfectantes de OX40L produjeron por lo menos 10 veces más IL-2 e IL-13 que aquellas cebadas en presencia de células L (Figura 2). Los niveles de producción de citocina fueron medidos utilizando un kit de ELISA de R&D Systems (Minneapolis, MN). Las células también proliferaron mucho más en presencia de la co-estimulación de OX40 como se muestra en la Figura 3). Para las Figuras 2 y 3: los cuadros abiertos representan CD4 natural; los triángulos abiertos representan CD4⁺ natural con células L testigo; los triángulos sólidos representan B66 con CD4⁺ naturales y células L OX40L; los cuadrados sólidos representan 2C4 (Control de isotipo) con células CD4⁺ naturales y células L OX40L; y los círculos sólidos representan un control de mAb irrelevante G3-519 con células CD4⁺ naturales y células L OX40.

La adición del mAb anti-OX40 B66 al cultivo inhibió la liberación de citocina (Figura 2), la proliferación celular (Figura 3) e indujo apoptosis de manera dependiente de la dosis en células L CD4⁺ cebadas en comparación con los testigos 2C4 o G3-519 (Tabla 4).

Tabla 4

	Células apoptóticas (%)	Inhibición de supervivencia (%)
Células T CD4 ⁺ Naturales + Células L	21.9	22
Células T CD4 ⁺ Naturales + Células L OX40L	11.0	11
Células T CD4 ⁺ Naturales + Células L OX40L + B66 (20 µg/ml)	37.9	38

EJEMPLO 5: CARACTERIZACIÓN ADICIONAL DE mAb ANTI-OX40**ANTAGONISTAS SELECCIONADOS**

Las citocinas pueden controlar la diferenciación de células T CD4+ naturales creando subconjuntos de células T que son definidas por su perfil de producción de citocina. IL-12 impulsa la diferenciación de células Th1 que producen principalmente IFN- γ e IL-2 y son responsables para controlar la inmunidad moderada por la célula y respuestas pro-inflamatorias. IL-4 polariza las células T CD4+ naturales hacia células Th2 que producen principalmente IL-4 e IL-5 y son responsables por el control de inmunidad humoral y respuestas anti-inflamatorias. Dos mAb anti-OX40, A10 y B66 seleccionados de la caracterización inicial fueron probados tanto en células Th1 y Th2 en cuanto a su habilidad para bloquear la proliferación de supervivencia y liberación de citocina. Para hacer esto, fueron convertidas primero a una forma quimérica que comprende las regiones variables del anticuerpo padre murino y regiones constantes humanas. Todos los anticuerpos comerciales y citocinas fueron comprados de BD Biosciences, CA.

A. Análisis de Th1

Células T CD4+ naturales humanas fueron aisladas de la cubierta amarilla de sangre humana utilizando un kit como se describe en el Ejemplo 4 (B)(2) anterior. Las células fueron cebadas durante 7 días para inducir un perfil de producción de Th1-citocina utilizando 5 μ g/ml de

anti-CD3 (OKT3, 1 µg/ml de anti-CD28 (CD28.2) y 10 µg/ml de anticuerpo neutralizante anti-IL-4 (MP4-25D2) en un medio complementado con 50 ng/ml de IL-12 citocina. Las células fueron cultivadas con mAb anti-CD3 y anti-CD28 en presencia
5 de células L OX40L-transfectadas irradiadas o células L padres a una proporción de 1:4 (células L/células T CD4+ naturales). La co-estimulación de OX40 incrementa la supervivencia de células efectoras Th1 como se muestra por una disminución en el número de células CD4+ positivas por
10 el teñido de anexina (Tabla 5). La adición del mAb anti-OX40 quimérico B66 al comienzo del co-cultivo de células L irradiadas inhibió esta supervivencia. La co-estimulación de OX40 también incrementa la producción de IFN-γ y la adición de B66 inhibió su producción de manera dependiente
15 de la dosis (Tabla 6).

TABLA 5

	Sobrevivencia de Th1 (%)
Células T CD4+ Naturales + Células L	52.6
Células T CD4+ Naturales + Células L OX40L	65.9
Células T CD4+ Naturales + Células L OX40L + B66 (0.2 µg/ml)	58.4
Células T CD4+ Naturales + Células L OX40L + B66 (2 µg/ml)	55.9
20 Células T CD4+ Naturales + Células L OX40L + B66 (20 µg/ml)	53.2

TABLA 6

	Concentración de IFN-γ (pg/ml)	Desviación Estándar (n:3)
25 Células Th1	10280.2	123.0
Células Th1 + Células L	10934.4	267.7
Células Th1 + Células L OX40L	33040.4	237.5
Células Th1 + Células L OX40L + B66 (0.2 µg/ml)	17148.3	234.6
Células Th1 + Células L OX40L + B66 (2 µg/ml)	11049.3	141.7
Células Th1 + Células L OX40L + B66 (20 µg/ml)	11540.6	51.6

B. Análisis de Th2

Células T CD4⁺ naturales humanas fueron aisladas como se describe anteriormente. Las células fueron cebadas durante 7 días para inducir un perfil de producción de Th2-citocina utilizando 5 µg/ml de anti-CD3, 1 µg/ml de anti-CD28 y 10 µg/ml de anticuerpo neutralizante anti-IFN-γ en un medio complementado con 50 ng/ml de IL-4 citocina. Las células fueron cultivadas con mAb anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de células L OX40L-transfectadas irradiadas o células L padres a una proporción de 1:4 (células L/células T CD4⁺ naturales). La co-estimulación de OX40 incrementa la supervivencia de células efectoras Th2 como se muestra por una disminución en el número de células CD4⁺ positivas por el teñido de anexina (Figura 4). La adición de mAb anti-OX40 A10 y B66 al comienzo del co-cultivo de células L irradiadas inhibió esta supervivencia (Figura 4), también como la proliferación de células Th2 (Figura 5) y producción de citocina de IL-2 (Figura 6A e IL-13 (Figura 6B) de manera dependiente de la dosis.

20

C. Análisis de Th17

Un subconjunto único de células T cebadas por la presencia de IL-23 es caracterizado por la producción de IL-17 e involucrado crucialmente en la patogénesis de ciertas enfermedades inflamatorias crónicas. Datos recientes han demostrado que las células Th17 representan un linaje completamente separado de células T CD4⁺ que divergen prematuramente de los linajes de Th1 y Th2 y es antagonizada por las citocinas y rutas de señalización que

25

gobiernan el desarrollo de células Th1 y Th2. Células T Th17 fueron cebadas para estudiar el efecto de co-estimulación de OX40 y la habilidad de los mAb anti-OX40 antagonistas para inhibir la diferenciación de Th17.

5 Células T CD4+ naturales fueron aisladas de cubierta amarilla como se describe en el Ejemplo 4(B)(2). Estas células fueron cebadas durante 7 días en presencia de 100 ng/ml de citocina IL-23 (R&D, Minneapolis, MN), 20 ng/ml cada uno de hIL-6 y hTGF β 1, 5 μ g/ml de anti-CD3 pre-
10 recubierto (OKT3, BD Biosciences, CA), 1 μ g/ml de anti-CD28 soluble (CD28.2), 10 μ g/ml cada uno de anti-IL4 (MP4-25D2) y anti-IFN- γ (B27). Las células cebadas fueron lavadas y sub-cultivadas por 3 días adicionales con mAb anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de células L OX40L-transfectadas
15 irradiadas o células L padres a una proporción de 1:4 (células L/células T CD4+ naturales). Al inducir la co-estimulación de OX40 por medio de células OX40L L, las células Th17 proliferan 4 veces en comparación con las mismas células cultivadas en ausencia de co-estimulación de
20 OX40L. Los mAb anti-OX40 A10 y B66 inhibieron la proliferación de Th17 de manera dependiente de la dosis (Tabla 7)).

TABLA 7

5		CMP Media (n:3)	± Desviación Estándar
	Células Th17 + Células L	18092	2592.6
	Células Th17 + Células L OX40L	66035.7	2106.2
	Células Th17 + Células L OX40L + Control de Isotipo (20 µg/ml)	70176.7	3080.8
	Células Th17 + Células L OX40L + A10 (0.2 µg/ml)	70176.7	7622.6
10	Células Th17 + Células L OX40L + A10 (2 µg/ml)	40347.7	8059.5
	Células Th17 + Células L OX40L + A10 (20 µg/ml)	17456.7	563.9
	Células Th17 + Células L OX40L + B66 (0.2 µg/ml)	46735.3	10667.1
	Células Th17 + Células L OX40L + B66 (2 µg/ml)	31658.0	5492.6
	Células Th17 + Células L OX40L + B66 (20 µg/ml)	18336.3	956.4

La Tabla 8 demuestra que OX40L mejoró significativamente la supervivencia de Th-17 (68% vs. 84%).

15 Esta supervivencia mejorada fue inhibida por mAb anti-OX40 A10 y B66 de manera dependiente de la dosis (Tabla 8).

TABLA 8

20		Sobrevivencia de Th17 (%)
	Células Th17 + Células L	68.4
	Células Th17 + Células L OX40L	84.3
	Células Th17 + Células L OX40L + Control de Isotipo (20 µg/ml)	84.3
	Células Th17 + Células L OX40L + A10 (0.2 µg/ml)	80.7
25	Células Th17 + Células L OX40L + A10 (2 µg/ml)	72.3
	Células Th17 + Células L OX40L + A10 (20 µg/ml)	70.7
	Células Th17 + Células L OX40L + B66 (0.2 µg/ml)	77.0
	Células Th17 + Células L OX40L + B66 (2 µg/ml)	74.1
	Células Th17 + Células L OX40L + B66 (20 µg/ml)	67.3

Al evaluar la expresión intracelular de la proteína Survivina, que es un inhibidor de apoptosis y un objetivo potencial de la proteína OX40, la estimulación de

OX40 mejoró su expresión. Esta expresión mejorada fue inhibida por los mAb anti-OX40 A10 y B66 de manera dependiente de la dosis (Tabla 9).

5

TABLA 9

	Expresión de Survivina (%)
Células Th17 + Células L	19.2
Células Th17 + Células L OX40L	49.0
Células Th17 + Células L OX40L + Control de Isotipo (20 µg/ml)	45.4
Células Th17 + Células L OX40L + A10 (0.2 µg/ml)	34.3
Células Th17 + Células L OX40L + A10 (2 µg/ml)	22.8
Células Th17 + Células L OX40L + A10 (20 µg/ml)	15.4
Células Th17 + Células L OX40L + B66 (0.2 µg/ml)	45.2
Células Th17 + Células L OX40L + B66 (2 µg/ml)	28.3
Células Th17 + Células L OX40L + B66 (20 µg/ml)	20.3

10

En comparación con las células cebadas Th1, las células Th17 mostraron niveles significativamente más altos de IL-17 después de 7 días de cebado de células T CD4+ naturales. Después de un co-cultivo adicional de Th17 con células L transfectadas por OX40L irradiadas co células L padres, las células Th17 produjeron niveles significativos de IL-17 en presencia de co-estimulación de OX40 en comparación con células cebadas Th1. Esta producción de IL 17 fue inhibida por mAb anti-OX40 quiméricos A10 y B66 de manera dependiente de la dosis (Tabla 10) en comparación con el control de isotipo G3-519 (IC).

20

TABLA 10

	TH-17		TH-1	
	Concentración de IL-17 (pg/ml)	SD (n:3)	Concentración de IL-17 (pg/ml)	SD (n:3)
Células CD4 ⁺ + Células L	409.7	41.1	29.8	5.4
Células CD4 ⁺ /Células L OX40L	2264.1	40.8	20.5	4.7
Células CD4 ⁺ /Células L OX40L + Control de Isotipo (20 µg/ml)	2032.7	90.0	56.1	10.7
Células CD4 ⁺ /Células L OX40L + A10 (0.2 µg/ml)	2054.6	254.0	41.4	8.4
Células CD4 ⁺ /Células L OX40L + A10 (2 µg/ml)	1795.1	304.6	39.3	9.4
Células CD4 ⁺ /Células L OX40L + A10 (20 µg/ml)	1059.9	448.6	54.1	5.7
Células CD4 ⁺ /Células L OX40L + B66 (0.2 µg/ml)	2296.3	56.8	56.6	5.8
Células CD4 ⁺ /Células L OX40L + B66 (2 µg/ml)	1144.0	224.5	63.1	3.7

25

D. Comparación con L106

La habilidad de los mAb anti-OX40 A10 y B66 para inhibir la liberación de citocinas IL-2 e IL-13 de células T CD4+ humanas activadas en presencia de co-estimulación de OX40 fue comparada con el anticuerpo anti-OX40 comercial L106 (BD Bioscience, San Jose, CA) utilizando el mismo protocolo del Ejemplo 4(B)(2). La inhibición de producción de citocina por L 106 no fue estadísticamente diferente del anticuerpo de control (véase Figura 7). De aquí, el anticuerpo pareció ser no funcional (esto es, ninguna actividad agonista o antagonista).

EJEMPLO 6: HUMANIZACIÓN DE UN mAb ANTI-OX40

Las secuencias de ácidos nucleicos de la región variable de cadena pesada (V_H) y la región variable de cadena ligera (V_L) del mAb murino A10 y B66 son ilustradas en las Figuras 14A-D. La Figura 12 proporciona las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de anticuerpos murinos (derivados de la secuencia de ADN) de 252-B66 y 252-A10 en comparación con la plantilla de cadena ligera humana escogida. Ambos anticuerpos actúan

como antagonistas de OX40 y compiten entre sí. Estas secuencias fueron comparadas con secuencias de línea germinal de anticuerpo humano disponibles en bases de datos públicas. Varios criterios fueron usados cuando se decide
5 en una plantilla, en los que se incluyen la longitud global, posición de CDR similar dentro de la estructura, homología global, tamaño de la CDR, etc. Todos estos criterios tomados conjuntamente proporcionan un resultado para escoger la plantilla humana óptima como se muestra en
10 la alineación de secuencias entre las secuencias de cadena pesada y ligera de mAb A10 y B66 y las respectivas secuencias de plantilla humanas ilustradas en las Figuras 12A y B. Un Fab quimérico en un vector de fago fue construido como testigo que combinó las regiones variables
15 del murino A10 y la región constante de la cadena kappa humana y la parte CH1 de IgG humana.

En este caso, más de una plantilla de estructura humana fue usada para diseñar este anticuerpo. La plantilla humana escogida para la cadena de V_H fue una combinación de
20 IGHV 1-46 del subgrupo V1 (Número de Acceso Gene Bank X92343) y línea germinal IGHJ4 (número de acceso de Gene Bank J00256) (véase Figura 12B). La plantilla humana escogida para la cadena V_L fue una combinación de IGKV4-1 (número de acceso de Gene Bank Z00023) y la plantilla de
25 línea germinal J IGHJ1 (número de acceso de Gene Bank J00242) (véase Figura 12A). La Figura 12B proporciona la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo murino (derivado de la secuencia de ADN), su alineación con plantillas de línea germinal humana

seleccionadas y la secuencia de la región variable humanizada de A10(TH)hu336F. La numeración de la secuencia de aminoácidos se hace de acuerdo con el método de Kabat. Las CDR murinas de A10 fueron insertadas sobre una
5 estructura variable humana. En esta secuencia, el número total de residuos de aminoácidos en la estructura es 87, el número total de residuos de aminoácidos diferentes entre la estructura humana y murina es 21 y no se retienen residuos murinos en la estructura de la cadena pesada humanizada.

10 La comparación de secuencias reveló que el anticuerpo murino B66 difería de A10 en solamente cuatro aminoácidos en la secuencia variable, pero el análisis funcional discutido en el Ejemplo 4 mostrado anteriormente demostró que B66 tuvo enlace y habilidad antagonista de
15 OX40 más alta. Dos de los cambios de aminoácidos en B66 estuvieron ubicados en la primera CDR y son cambios de la secuencia de línea germinal de ratón. Se razonó que estos cambios podrían ser responsables por la actividad mejorada del B66. Sin embargo, cuando las CDR de estos anticuerpos
20 fueron insertadas dentro de una estructura variable humana, B66 secretó deficientemente y fue por consiguiente, menos apropiado para desarrollo adicional. Por consiguiente, la CDRL1 de B66 y CDRL2 y CDRL3 de A10 fueron escogidas para insertar sobre una plantilla variable humana para elaborar
25 un antagonista anti-OX40 humanizado. Mediante este método, la afinidad de enlace y actividad antagonista de la molécula A10 humanizada fue incrementada en relación con el anticuerpo murino padre.

A. Análisis cinético de Fab de anti-OX40 mediante BiaCore

La Figura 13 muestra el enlace de OX40 de la molécula resultante en comparación con la molécula murina original. La CDRL1 fue también mutada para reflejar la
5 secuencia de CDRL1 original de A10. El reemplazo de la CDRL1 de A10 con la CDRL1 de B66 dio como resultado actividad de enlace incrementada de la molécula A10 "humanizada" A10(TH)hu336F. La Figura 15 muestra que el
clon humanizado A10(TH)hu336F, A10 murino y su forma
10 quimérica computen igualmente bien por OX40.

EJEMPLO 7: CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES HUMANIZADAS DE

A10 (TH) HU336F

15 Seis variantes del candidato A10 humanizado A10(TH)hu336F fueron seleccionadas utilizando un análisis de ELISA de enlace, análisis de enlace a base de célula y
análisis funcionales adicionales que demuestran su actividad antagonista. Dos de los seis A10 humanizados, las
20 variantes A10-D y F fueron sometidas a seis análisis funcionales.

Las regiones variables humanizadas descritas anteriormente fueron clonadas a vectores de expresión
mamíferos de tal manera que las regiones variables
25 humanizadas fueron fusionadas en cuadro con regiones constantes humanas cuando son expresadas. Candidatos humanizados adicionales fueron también clonados a vectores de expresión mamíferos para producir anticuerpo entero para pruebas. Estos candidatos adicionales incluyen la región VL

de A10 humanizada con la CDRL1 de A10 original (A y D), la
región VL de A10 humanizada con el número de Kabat 34
cambiado de asparagina (N) a histidina (H) (B y E) (la CDR-
L1 en esta variante comprende la secuencia de aminoácidos
5 KASQTVDYDGDSYMH (SEQ ID NO: 61) y una región VH humanizada
alternativa que contiene una leucina murina (L) en el
número secuencial 70 (A10 L70) (número de Kabat 69). Los
anticuerpos fueron expresados en células mamíferas en las
combinaciones mostradas en la Tabla 11. La Tabla 12 muestra
10 los datos de Biacore correspondientes. La secuencia de
ácidos nucleicos de las regiones variables de estos
candidatos humanizados también como las regiones variables
murinas son presentadas en la Figura 14.

15 **Tabla 11**

Nombre de anticuerpo entero	Candidato variable Kappa	Candidato variable pesado
A	A10 LC (SH)	A10 L70
B	A10 LC (SN)	A10 L70
C	A10 LC (TH) hu 336	A10 L70
D	A10 LC (SH)	A10 humanizado
E	A10 LC (SN)	A10 humanizado
F	A10 LC (TH) hu 336	A10 humanizado

20

Tabla 12

Muestra	KD [nM]	ka [M- 1s-1]	SE (ka)	kd [s-1]	SE (kd)	X ²
A	1.38	1.31 e5	452	1.79 e-4	7.44 e-7	0.257
B	0.94	1.70 e5	355	1.56 e-4	6.50 e-7	0.524
C	1.44	1.16 e5	483	1.51 e-4	8.28 e-7	0.352
D	1.21	1.40 e5	508	1.70 e-4	8.55 e-7	0.319
E	1.25	1.51 e5	391	1.91 e-4	8.48 e-7	0.395
F	1.12	1.41 e5	474	1.58 e-4	7.53 e-7	0.267

25

A. Análisis de células T CD4+ naturales TCR-activadas

Las células T CD4+ humanas naturales fueron

activadas de acuerdo con el mismo protocolo descrito en el Ejemplo 4 (B)(2) anterior. Después de siete días de cultivo, células T CD4+ naturales activadas en presencia de OX40L produjeron por lo menos 10 veces más IL-2, IL-5 e IL-13 y proliferaron significativamente más que lo hicieron aquellas cebadas en presencia a células L (Figura 8).

Las variantes humanizadas A10-D y A10-F inhibieron la liberación de citoquina (IL-2/IL-5/IL-13) y la proliferación de células T CD4+ al mismo nivel como las formas padre y quimérica murinas de A10 en comparación a un control isotipo (Figura 8).

B. Análisis de células T cebadas

Las variantes humanizadas A10-D y A10-F fueron probadas en cuanto a sus actividades antagonistas; inhibieron la proliferación y liberación de citoquina de células T cebadas Th1, células T cebadas Th2 y células Th17 en presencia de células L OX40L transfectadas irradiadas o células L padres (véanse protocolos en el Ejemplo 5).

Bajo condiciones de Th1, las variantes humanizadas A10-D y A10F inhibieron la producción de citoquinas de IL-2, IL-5, IL-13 y proliferación celular al mismo grado como los mA b quiméricos (CC-A10) y de ratón padre (M-A10) en comparación con el control de isotipo (Figura 9).

Bajo condiciones Th2, las variantes humanizadas A10-D y A10-F mostraron un efecto antagonista sobre las células T CD4+ activadas al inhibir su proliferación y liberación de citoquina (IL-2, IL-5 e IL-13). (Figura 10).

Las variantes humanizadas A10-D y A10-F fueron también probadas en paralelo con sus mAb anti-OX40 quiméricos y de ratón con el fin de comparar sus actividades antagonistas sobre la proliferación celular de Th17, producción de citoquina de IL-17 y apoptosis celular. Los resultados son mostrados en la Tabla 13.

TABLA 13

	Proliferación (CPM) ± SD	IL-17 (pg/ml) ± SD	GM-CSF (pg/ml) ± SD
Células Th17+L	23997 ± 1715	14 ± 9	319 ± 290
Th17+OX40L-células L	167684 ± 581	858 ± 205	1941 ± 246
Th17+OX40L-células L+A10-D (0.3 µg/ml)	87715 ± 10048	313 ± 76	1730 ± 187
Th17+OX40L-células L+A10-D (3 µg/ml)	11486 ± 1901	107 ± 49	533 ± 120
Th17+OX40L-células L+A10-D (30 µg/ml)	12365 ± 3514	184 ± 214	410 ± 312
Th17+OX40L-células L+A10-F (0.3 µg/ml)	65957 ± 18160	240 ± 37	1414 ± 240
Th17+OX40L-células L+A10-F (3 µg/ml)	10376 ± 2628	152 ± 26	455 ± 108
Th17+OX40L-células L+A10-F (30 µg/ml)	9380 ± 2673	106 ± 33	203 ± 63
Th17+OX40L-células L+CC-A10 (0.3 µg/ml)	94905 ± 15869	278 ± 46	1743 ± 303
Th17+OX40L-células L+CC-A10 (3 µg/ml)	17566 ± 1636	135 ± 55	626 ± 224
Th17+OX40L-células L+CC-A10 (30 µg/ml)	9029 ± 2090	125 ± 58	235 ± 125
Th17+OX40L-células L+M-A10 (0.3 µg/ml)	106682 ± 8066	373 ± 99	1550 ± 695
Th17+OX40L-células L+M-A10 (3 µg/ml)	18797 ± 4807	88 ± 9	253 ± 23
Th17+OX40L-células L+M-A10 (30 µg/ml)	6934 ± 997	97 ± 48	40 ± 16
Th17+OX40L-células L+IC (0.3 µg/ml)	168442 ± 21659	866 ± 218	1937 ± 131
Th17+OX40L-células L+IC (3 µg/ml)	151481 ± 3176	862 ± 371	1861 ± 295
Th17+OX40L-células L+IC (30 µg/ml)	149621 ± 6010	918 ± 529	1575 ± 229

Por medio de la identificación de células apoptóticas mediante citometría de flujo y teñido de Anexina-V, los datos presentados en la Tabla 12 demuestran que OX40L disminuyó significativamente la apoptosis Th17, mientras que las variantes humanizadas A10-D y A10-F incrementaron la apoptosis de manera dependiente de la dosis, en comparación con un tratamiento de control de isotipo G3-159 (UC) (Tabla 14).

TABLA 14

	Sobrevivencia de TH17 (%)
Th17+células L	20.4
Th17+OX40L-células L	39.2
Th17+OX40L-células L+A10-D (0.3 µg/ml)	49.6
Th17+OX40L-células L+A10-D (3 µg/ml)	18.0
Th17+OX40L-células L+A10-D (3.0 µg/ml)	22.3
Th17+OX40L-células L+IC (0.3 µg/ml)	46.6
Th17+OX40L-células L+IC (3 µg/ml)	47.1
Th17+OX40L-células L+IC (30 µg/ml)	44.8

C. Células dendríticas Th2/TSLP

10 Células dendríticas CD11c⁺ (CD) fueron aisladas de la cubierta amarilla de sangre humana de voluntarios adultos saludables. La población CD-enriquecida fue obtenida a partir de PBMC mediante inmunoselección negativa utilizando una mezcla de mAb contra los marcadores de

15 linaje CD3 (OKT3), CD14 (M5E2), CD15 (HB78), CD20 (L27), CD56 (B159) y CD235α (10F7MN). La población se hizo pasar a través de perlas magnéticas IgG-recubiertas anti-ratón de cabra (M-450; Miltenyi Biotec; CA) para remover las células enlazadas. El linaje CD11c⁺ y células CD4⁺ fueron aisladas

20 mediante un FACS Aria (utilizando anti-CD11c (APC)-marcado alofococuanina (B-ly6)), una mezcla de mAb FITC-marcados CS19 (HIB19) y CD56 (NCAM16.2) y CD AP-Cy7-marcado (RPA-T4) para llegar a > 99% de pureza. Los CD CD11c⁺ fueron cultivadas en un medio de Yssel que contiene suero AB

25 humano al 2% (Gemini Bio-Products, Woodland, CA). Las células fueron sembradas a una densidad de 2 x 10⁵ células/200 ml de un medio en placa de 96 cavidades de fondo plano en presencia de 15 ng/ml de TSLP (TSLP humana recombinante donado generosamente por el Dr. Yun-Jun Liu,

M.D. Anderson Cancer Center) durante 24 horas.

Células T naturales CD45RA⁺ CD4⁺ alogénicas (pureza >99%) fueron aisladas utilizando el kit II-3 para aislamiento de células T CD4⁺ (Miltenyi Biotec, CA) según el protocolo de clasificación celular (como una fracción de CD4⁺ CD45RO⁺-CD25⁻). Las células fueron co-cultivadas con células dendríticas mieloides TSLP-estimuladas lavadas (1:1) (proporción de CD/células T, 1:5) en una placa de cultivo de 96 cavidades de fondo redondo durante 7 días. Después de un ciclo de estimulación (7 días) por las mCD, las células T CD4⁺ cebadas fueron recolectadas y lavadas.

Para la detección de producción de citoquinas en los sobrenadantes del cultivo, las células T fueron estimuladas con anti-CD3 5µg/ml enlazado a la placa de 96 µg/ml de anti-CD28 soluble a una concentración de 10⁵ células/ml por 48 horas. Los niveles de IL-5, IL-13 y TNF-α fueron medidos mediante ELISA. La proliferación celular y la producción de citoquina en células Th2 cebadas con células mieloides TSLP-activadas fueron inhibidas en presencia de la variante humanizada A10-F, en comparación con anticuerpo de control de isotipo (Tabla 15).

25

TABLA 15

	Proliferación (CPM) ± SD	IL-5 (pg/ml) ± SD	IL-13 (pg/ml) ± SD	TNF-α (pg/ml)
Th2	2475 ± 31	0	0	
Th2+TSLP-CD	195546 ± 17034	2188 ± 560	5107 ± 934	456
Th2+TSLP-CD-A10-F (0.12 µg/ml)	95335 ± 13716	2109 ± 811	1973 ± 289	174
Th2+TSLP-CD-A10-F (6 µg/ml)	70750 ± 19116	509 ± 93	1943 ± 68	95
Th2+TSLP-CD-A10-F (60 µg/ml)	56792 ± 2993	384 ± 133	1728 ± 243	93
Th2+TSLP-CD-IC (0.12 µg/ml)	191760 ± 1838	3271 ± 652	5341 ± 1184	543
Th2+TSLP-CD-IC (6 µg/ml)	211124 ± 16370	1885 ± 281	4887 ± 673	392
Th2+TSLP-CD-IC (12 µg/ml)	213641 ± 14303	2261 ± 116	5632 ± 356	474

5 Para la producción de citoquina intracelular, las
células T CD4⁺ cebadas fueron estimuladas con 50 ng/ml de
PMA más 2 µg/ml de ionomicina durante 6 horas. Diez µg/ml
de brefeldina A (eBioscience, San Diego, CA) fueron
agregados durante las 2 horas finales. Las células fueron
10 teñidas con la combinación mAb PE-marcados a IL-2 e IL-13 y
anti IFN-γ FITC-marcados o anti-TNF-α utilizando soluciones
reguladoras del pH de Fijación y Permeabilización
(eBioscience, CA). La producción de citoquina IL-2, IL-13 y
TNF-α en células Th2 cebadas con CD mieloides TSLP-
15 activadas fue inhibida en presencia de la variante
humanizada A10-F, en comparación con un anticuerpo de
control de isotipo (Tabla 16).

20

TABLA 16

25

	IL-2 % de células fluorescentes	IL-13 % de células fluorescentes	TNF-α % de células fluorescentes
Th2	NA	NA	NA
Th2+TSLP-CD	71	11	44
Th2+TSLP-CD+A10-F (0.12 µg/ml)	63	10	31
Th2+TSLP-CD+A10-F (6 µg/ml)	57	5	30
Th2+TSLP-CD+A10-F (60 µg/ml)	57	5	28
Th2+TSLP-CD+IC (0.12 µg/ml)	72	15	53
Th2+TSLP-CD+IC (6 µg/ml)	73	13	54
Th2+TSLP-CD+IC (12 µg/ml)	69	16	49

La coestimulación de OX40 incrementó la supervivencia de células Th2 cebadas como se muestra por una disminución en el número de células CD4+ teñidas con anexina y un número incrementado de células CD4+ con expresión de proteína Survivina intracelular. Sin embargo, la adición de la variante humanizada A10-F al cultivo celular indujo un incremento significativo en apoptosis y una expresión más baja de Survivina (Tabla 17).

10

15

TABLA 17

		Teñido con Anexina (%)	Survivina (%)
20	Th2	NA	NA
	TH2+TSLP-CD	12	90
	Th2+TSLP-CD+A10-F (0.12 µg/ml)	24	86
	Th2+TSLP-CD+A10-F (6 µg/ml)	29	76
	Th2+TSLP-CD+A10-F (60 µg/ml)	35	70
	Th2+TSLP-CD+IC (0.12 µg/ml)	14	80
	Th2+TSLP-CD+A10-F (6 µg/ml)	14	86
25	Th2+TSLP-CD+A10-F (60 µg/ml)	14	90

D. Protocolo de Th1/LPS-CD

Para analizar la polarización de células T hacia un perfil de Th1, células T CD4 naturales fueron co-

cultivadas con CD monocito-derivadas alogénicas que habían sido estimuladas con LPS durante 24 horas. Las CD fueron generadas a partir de PBMC mediante el protocolo estándar bien conocido en el arte. Las PBMC de baja densidad fueron cosechadas y células CD14⁺ fueron seleccionadas positivamente usando microperlas de CD14 y equipo de AutoMacs (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Para inducir la diferenciación de CD, 10⁶ células/ml de monocitos CD14⁺ fueron cultivadas en un medio completo (RPMI-FBS al 10%), 500 IU/ml de rGM-XSF humano (R y D Systems, MN) y 400 IU/ml de rIL-4 humana (R y D Systems, MN) a 37° C bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. En el día 2 o 3, los cultivos CD recibieron una dosis adicional de GM-CSF e IL-4. En el día 5, las CD no adherentes fueron cosechadas mediante pipeteado moderado y re-cultivadas con 1 µg/ml de LPS (Sigma-Aldrich, MO). Las CD LPS-activadas fueron cosechadas, lavadas y usadas para cebar células T CD4 naturales a células T Th1 polarizadas. Las células fueron incubadas en una placa de 96 cavidades a una proporción de CD/T de 1:4. Las variantes humanizadas A10-D y A10-F fueron también probadas en cuanto a sus actividades antagonistas y la habilidad para inhibir la proliferación y producción de citoquina de células T Th1 cebadas en presencia de CD LPS-activadas. Las variantes humanizadas A10-D y F inhibieron la producción de citoquinas IL-2, IFN-γ y TNF-α y proliferación celular al mismo grado como los mAb variantes quiméricos (CC-A10) y de ratón (MA-10), en comparación con un control de isotipo (Figura 11). La inhibición de proliferación celular y producción de citoquinas de IFN-γ y

TNF- α no fue total debido a que las CD LPS-activadas propocionan otras señales coestimulatorias diferentes a OC40.

5 **E. Análisis de reactividad cruzada**

De acuerdo con la literatura publicada, la homología compartida entre la proteína de IX40 humana y de ratón es considerada baja. Consistente con esto, el A10 y B66 quiméricos no muestran ninguna reactividad cruzada hacia la proteína de OX40 de ratón en comparación con un control de isotipo (IC:2C4) en la plataforma de ELISA (Tabla 18).

TABLA 18

15

	Fc IX40 de ratón (ng/ml)				Fc OX40 humano (ng/ml)			
	0	3.9	62.5	250	0	3.9	62.5	250
OD450								
B66	0.134	0.034	0.039	0.045	0.02	1.225	2.859	3.377
A10	0.025	0.04	0.035	0.035	0.019	1.308	2.586	2.832
IC (2C4)	0.035	0.046	0.078	0.294	0.02	0.031	0.027	0.031
Ab OX40 anti-ratón	0.051	2.486	4.0	4.0	0.026	0.047	0.046	0.083

Por consiguiente, se usó un teñido de citometría de flujo para probar los mAb anti-OX40 en un equipo de modelo de animal preclínico para determinar si reaccionan de manera cruzada con la proteína OX40 de mono. Células T CD4+ totales aisladas de sangre total de mono Rhesus y mono Cynomolgus y de cubierta amarilla humana utilizando microperlas de CD4 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Las células T CD4⁺ aisladas fueron activadas durante 2 días utilizando 5 μ g/ml de mAb anti-CD3 pre-recubierto (SP34, apto de reaccionar de manera cruzada con las proteína de CD3 humana y de ambas especies de mono Rhesus y Cynomolgus)

y 1 µg/ml de mAb anti-CD28 soluble (CD28.2, apto de reaccionar de manera cruzada tanto con proteína CD28 humana como con ambas especies de mono Rhesus y Cynomolgus). Las células fueron sometidas a teñido superficial utilizando anticuerpos que reaccionan de manera cruzada con las proteínas de CD4 (L200) de mono y humanas t CD25 (M-A251). Para la expresión de superficie celular de IX40, los mAb de OX40 A10-F conjugados a PE fueron utilizados. El análisis de datos demostró que A10-F reconocía fácilmente las células T CD4 activadas humanas, de Rhesus y Cynomolgus (Tabla 19).

TABLA 19

	% de células T CD4+ activadas reconocidas
Humano	70
Mono Cynomolgus	88
Mono Rhesus	75

EJEMPLO 8: MAPEO DE EPÍTOPO

El epítipo de OX40 al cual A10(TH)hu336F se enlaza es mapeado utilizando dos procedimientos estándar al mapeo de epítipo, despliegue de superficie de levaduras y construcción quimérica de moléculas. En el despliegue de superficie de levadura, el dominio extracelular de OX40 es expresado en Saccharomyces cerevisiae como una proteína de fusión que es apta de ser secretada y desplegada sobre la superficie de la levadura. La mutagénesis aleatoria del vector de expresión OX40 permiten que bibliotecas de proteínas mutantes OX40 sean expresadas sobre la superficie de levadura. Los mutantes que expresan proteína (tal como se determina por la presencia de una etiqueta C-terminal)

que fallan en enlazarse a OX40 pueden ser teñidos utilizando anticuerpos fluorescentes y aislados mediante FACS. Los plásmidos de expresión mutantes son aislados de la levadura rescatada y secuenciados para determinar cuáles
5 residuos de aminoácidos son requeridos para el enlace de A10 (TH) hu336F-OX40.

El segundo procedimiento de mapeo de epítipo depende de la observación de que A10 (TH) hu336F se enlaza a OX40 humano pero no murino. Moléculas de IX40 quiméricas
10 son construidas que tienen regiones de OX40 humano reemplazadas con regiones homólogas de OX40 murino. Las moléculas quiméricas son expresadas sobre la superficie de células mamíferas y el enlace a A10 (TH) hu336F marcado fluorescentemente es monitoreado mediante el FACS. El
15 epítipo de enlace de OX40 es determinado al analizar cuáles regiones de OX40 humanas son requeridas para el enlace de A10 (TH) hu336F.

Aquellos experimentados en el arte reconocerán o serán aptos de indagar utilizando no más que
20 experimentación de rutina, muchos equivalentes a las modalidades específicas de la invención descrita en la presente. Se pretende que tales equivalentes sean abarcados por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo antagonista aislado que se enlaza específicamente a un epítipo de OX40 humano, el anticuerpo esta caracterizado porque comprende:

5 (a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende:

(i) una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17;

(ii) una CDR2 de VH que tiene la secuencia de
10 aminoácidos de SEQ ID NO:18 y/o

(iii) una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 y/o

(b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende:

15 (i) una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12, 15 o 61;

(ii) una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 y/o

(iii) una CDR3 de VL que tiene la secuencia de
20 aminoácidos de SEQ ID NO:14 o 16.

2. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada (VH) que
25 comprende:

(i) una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17;

(ii) una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18 y

(iii) una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 y/o

(b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende:

5 (i) una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12;

(ii) una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 y

(iii) una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14.

3. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo comprende:

15 (a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende:

(i) una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17;

(ii) una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18 y

20 (iii) una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 y/o

(b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende:

25 (i) una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12;

(ii) una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 y

(iii) una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16.

4. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada (VH) que
5 comprende:

(i) una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17;

(ii) una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18 y

10 (iii) una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 y/o

(b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende:

(i) una CDR1 de VL que tiene la secuencia de
15 aminoácidos de SEQ ID NO:15;

(ii) una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 y

(iii) una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14.

20 5. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende:

25 (i) una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17;

(ii) una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18 y

(iii) una CDR3 de VH que tiene la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:19 y/o

(b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende:

(i) una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15;

(ii) una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 y/o

(iii) una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16.

6. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de SEQ ID NO:10 u 11 y/o

(b) una región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de SEQ ID NO: 7, 8 o 9.

7. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada (VH) codificada por cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 25, 26 o 27 y/o

(b) una región variable de cadena ligera (VL) codificada por cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23 o 24.

8. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque el anticuerpo

comprende:

(a) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEQ ID NO:10 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos ilustrada de SEQ ID NO: 7 u 8 o

5 (b) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEQ ID NO:11 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEQ ID NO: 9.

9. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque el anticuerpo
10 comprende:

(a) una VH codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 25 y una VL codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 20 o 21;

(b) una VH codificada por la secuencia de ácidos
15 nucleicos de SEQ ID NO: 26 y una VL codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 22, 23 o 24 o

(c) una VH codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 27 y una VL codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 22, 23 o 24.

20 10. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque la VH comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEQ ID NO: 10 y la VL comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEQ ID NO: 7.

25 11. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque la VH comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEQ ID NO: 10 y la VL comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEQ ID NO: 8.

12. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque la VH comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEQ ID NO: 11 y la VL comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEQ ID NO: 9.

13. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9, caracterizado porque comprende además una región constante.

14. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque comprende además una región constante de anticuerpo que comprende un dominio de CH1, CH2, o CH3.

15. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque la región constante es de un anticuerpo IgG.

16. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el anticuerpo de IgG es un anticuerpo IgG 1, un anticuerpo IgG 2, un anticuerpo IgG 3 o un anticuerpo IgG 4.

17. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo humano.

18. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo quimerico, anticuerpo humanizado, anticuerpo monoclonal o un anticuerpo recombinante.

19. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9,

caracterizado porque el anticuerpo es un Fab, Fab',
F(ab')₂, Fd Fv de una sola cadena, anticuerpo de una sola
cadena, Fv de sulfuro-enlazado, anticuerpo de un solo
dominio, fragmento de enlace de antígeno, diacuerpo,
5 triacuerpo o minicuerpo.

20. El anticuerpo de conformidad con cualquiera
de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9,
caracterizado porque comprende además un marcador.

21. El anticuerpo de conformidad con cualquiera
10 de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9,
caracterizado porque comprende además un citotoxina o
inmunotoxina..

22. Una molécula de ácido nucleico aislada,
caracterizada por que comprende una secuencia de
15 nucleótidos que codifica un anticuerpo de conformidad con
la reivindicación 1.

23. Un vector, caracterizado por que comprende la
molécula de ácido nucleico de conformidad con la
reivindicación 22.

20 24. Una célula huésped, caracterizada porque
comprende el vector de conformidad con la reivindicación
23.

25. Una composición caracterizada porque
comprende de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de
25 las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 y por lo
menos uno de un portador, diluyente, excipiente y
estabilizador aceptable fisiológicamente.

26. Un método para el tratamiento de una
alteración moderada por OX-40 en un paciente, caracterizado

porque comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 en donde el anticuerpo bloquea el enlace de OX40L a OX40 y/o inhibe una o mas funciones asociadas con el enlace de OX40L a OX40.

27. El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque la alteración moderada por OX40 es una enfermedad inflamatoria o autoinmune.

28. El método de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque la enfermedad es alergia, asma o enfermedades asociadas con autoinmunidad o inflamación, tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de intestino inflamatorio, enfermedad de injerto contra huésped, encefaleomielitis autoinmune experimental (EAE), neuropatía autoinmune, ureitis autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune, miastenia gravis, leishmaniasis experimental, artritis colageno-inducida, colitis (tal como colitis ulcerativa), reacciones de hipersensibilidad al contacto, diabetes, enfermedades Crohn, enfermedad de Grave, sarcoidosis, anemia perniciosa, arteritis temporal, síndrome anti-fosfolípido, vasculitis (tal como granulomatosis de Wegener), enfermedad de Behcet, dermatitis herpetiformis, pénfigo vulgaris, vitiligo, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune, tiroiditis de Hashimoto, ooforitis y orquitis autoinmune, enfermedad autoinmune de la glandula adrenal, lupus eritematoso sistémico, escleroderma, dermatomiositis, polimiositis,

dermatomiositis, espondiloartropatias (tales como espondilitis anquilosante), síndrome de Reiter o síndrome de Sjogren.

29. El método de conformidad con la
5 reivindicación 27, caracterizado porque la enfermedad es
alergia, asma o enfermedades asociadas con autoinmunidad o
inflamación, tales como esclerosis múltiple, artritis
reumatoide, enfermedad de intestino inflamatorio,
enfermedad de injerto contra huésped, encefaleomielitis
10 autoinmune experimental (EAE), leishmaniasis experimental,
artritis colágeno-inducida, colitis (tales como colitis
ulcerativa), reacciones de hipersensibilidad al contacto,
diabetes, enfermedad de Crohn o enfermedad de Grave.

30. El método de conformidad con la
15 reivindicación 26, caracterizado porque el anticuerpo es
administrado al paciente vía una o más de las rutas en las
que se incluyen intravenosa, intraperitoneal, inhalación,
intramuscular, subcutánea y oral.

31. Un método para el tratamiento de una
20 alteración al inhibir la producción de anticuerpo de IgE en
un paciente, caracterizado porque comprende administrar al
paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo de
conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3,
4, 5, 6, 7, 8 o 9.

25 32. El método de conformidad con la
reivindicación 31, caracterizado porque la alteración es
asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis alérgica,
anafilaxis, urticaria o dermatitis atópica.

33. Un método para reducir la severidad de asma

en un mamífero, caracterizado porque comprende administrar al mamífero una cantidad efectiva de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9, en donde el anticuerpo comprende por lo menos una de las siguientes propiedades: (a) se enlaza a OX40 humano con una K_d de entre aproximadamente 1×10^{-10} M a aproximadamente 1×10^{-12} M; (b) inhibe una o más funciones asociadas con el enlace de OX40 y (c) inhibe el enlace de OX40L a OX40.

10 34. El método de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque el anticuerpo se enlaza a OX40 humano con una K_D de entre aproximadamente 1×10^{-12} a aproximadamente 1×10^{-11} M, 1×10^{-11} M a aproximadamente 1×10^{-10} M, 1×10^{-10} a aproximadamente 1×10^{-9} M, 1×10^{-9} a aproximadamente 1×10^{-8} M o 1×10^{-8} a aproximadamente 1×10^{-7} M.

20 35. Un método para la producción de un anticuerpo caracterizado, porque comprende cultivar la célula de conformidad con la reivindicación 24 bajo condiciones apropiadas para la producción del anticuerpo y aislamiento del anticuerpo.

25 36. Un hibridoma caracterizado porque produce el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9.

 37. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9, caracterizado porque se usa en la preparación de un medicamento.

38. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9, caracterizado porque se usa para el tratamiento de una enfermedad o alteración relacionada con OX40.

5 39. El uso de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque la enfermedad es alergia, asma o enfermedades asociadas con autoinmunidad e inflamación, tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de intestino inflamatorio, enfermedad de injerto
10 contra huésped, encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), neuropatías autoinmunes, ureitis autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune, miastenia gravis, leishmaniasis experimental, artritis colageno-inducida, colitis (tal como colitis ulcerativa),
15 reacciones de hipersensibilidad al contacto, diabetes, enfermedad de Crohn, enfermedad de Grave, sarcoidosis, anemia perniciosa, arteritis temporal, síndrome anti-fosfolípido, vasculitis (tales como granulomatosis de Wegener), enfermedad de Behcet, dermatitis herpetiformis,
20 pénfigo vulgaris, vitiligo, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune, tiroiditis de Hashimoto, ooforitis y orquitis autoinmune, enfermedad autoinmune de la glandula adrenal, lupus eritematoso sistémico, escleroderma, dermatomiositis, polimiositis, dermatomiositis,
25 espondiloartropatias (tales como espondilitis anquilosante), síndrome de Reiter o síndrome de Sjogren.

40. El uso de conformidad con la reivindicación 39, caracterizado porque la enfermedad es alergia, asma o enfermedades asociadas con autoinmunidad e inflamación,

tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de intestino inflamatorio, enfermedad de injerto contra huésped, encefaleomielitis autoinmune experimental (EAE), leishmaniasis experimental, artritis colágeno-inducida, colitis (tal como colitis ulcerativa), reacciones de hipersensibilidad al contacto, diabetes o enfermedad de Crohn.

41. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9, caracterizado porque se usa para detectar OX40.

42. Un método para la detección de OX40 en una muestra, caracterizado porque comprende poner en contacto la muestra en el anticuerpo de conformidad con la reivindicación 20.

43. Un kit caracterizado porque comprende el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 en una cantidad determinada en un recipiente y una solución reguladora del pH en un recipiente separado.

44. Un kit caracterizado porque comprende la composición de conformidad con la reivindicación 25 en una cantidad determinada en un recipiente y una solución reguladora del pH en un recipiente separado.

45. Un dispositivo médico caracterizado porque comprende el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9.

46. El dispositivo médico de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado porque es un dispositivo de inhalación.

47. Un dispositivo medico caracterizado porque comprende la composición de conformidad con la reivindicación 25.

48. El dispositivo medico de conformidad con la
5 reivindicación 47, caracterizado porque es un dispositivo de inhalación.

cADN de OX40 humano (No. de acceso NM_004295)

cgaggatgtg	cgtgggggct	cggcggctgg	gccgcggggc	gtgtgcggct	ctgctcctcc	60
tgggcctggg	gctgagcacc	gtgacggggc	tccactgtgt	cggggacacc	taccccagca	120
acgaccggtg	ctgccacgag	tgcaggccag	gcaacgggat	ggtgagccgc	tgcagccgct	180
cccagaacac	ggtgtgccgt	ccgtgcgggc	cgggcttcta	caacgacgtg	gtcagctcca	240
agccgtgcaa	gccctgcacg	tggtgtaacc	tcagaagtgg	gagtgagcgg	aagcagctgt	300
gcacggccac	acaggacaca	gtctgccgct	gccgggcggg	cacccagccc	ctggacagct	360
acaagcctgg	agttgactgt	gccccctgcc	ctccagggca	cttctcccca	ggcgacaacc	420
aggcctgcaa	gccctggacc	aactgcacct	tggctgggaa	gcacaccctg	cagccggcca	480
gcaatagctc	ggacgcaatc	tgtgaggaca	gggaccccc	agccacgcag	ccccaggaga	540
cccagggcc	cccggccagg	cccatactg	tccagcccac	tgaagcctgg	cccagaacct	600
cacagggacc	ctccacccgg	cccgtggagg	tccccggggg	ccgtgcgggt	gccgccatcc	660
tgggcctggg	cctggtgctg	gggctgctgg	gccccctggc	catcctgctg	gccctgtacc	720
tgctccggag	ggaccagagg	ctgcccccg	atgccacaaa	gccccctggg	ggaggcagtt	780
tccggacccc	catccaagag	gagcaggccg	acgcccactc	caccctggcc	aagatctgac	840
ctgggcccac	caagggtggac	gctgggcccc	gccaggctgg	agcccggagg	gtctgctggg	900
cgagcagggc	aggtgcaggc	cgcctgcccc	gccacgctcc	tgggccaact	ctgcaccggt	960
ctaggtgccg	atggctgcct	ccggctctct	gcttacgtat	gccatgcata	cctcctgccc	1020
cgcgggacca	caataaaaac	cttggcagac	gggagtctcc	gaccggcaaa	aaaaaaaaaa	1084
aaaa						
(SEQ ID NO:1)						

FIG.1A

Secuencia de aminoácidos de OX40 humano (No. de acceso NM_003318)

```
      10      20      30      40      50
MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN

      60      70      80      90     100
GMVSRCSRSQ NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT

     110     120     130     140     150
ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA

     160     170     180     190     200
GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ

     210     220     230     240     250
GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL RRDQRLPPDA

     260     270     277
HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI. (SEQ ID NO:2)
```

FIG.1B

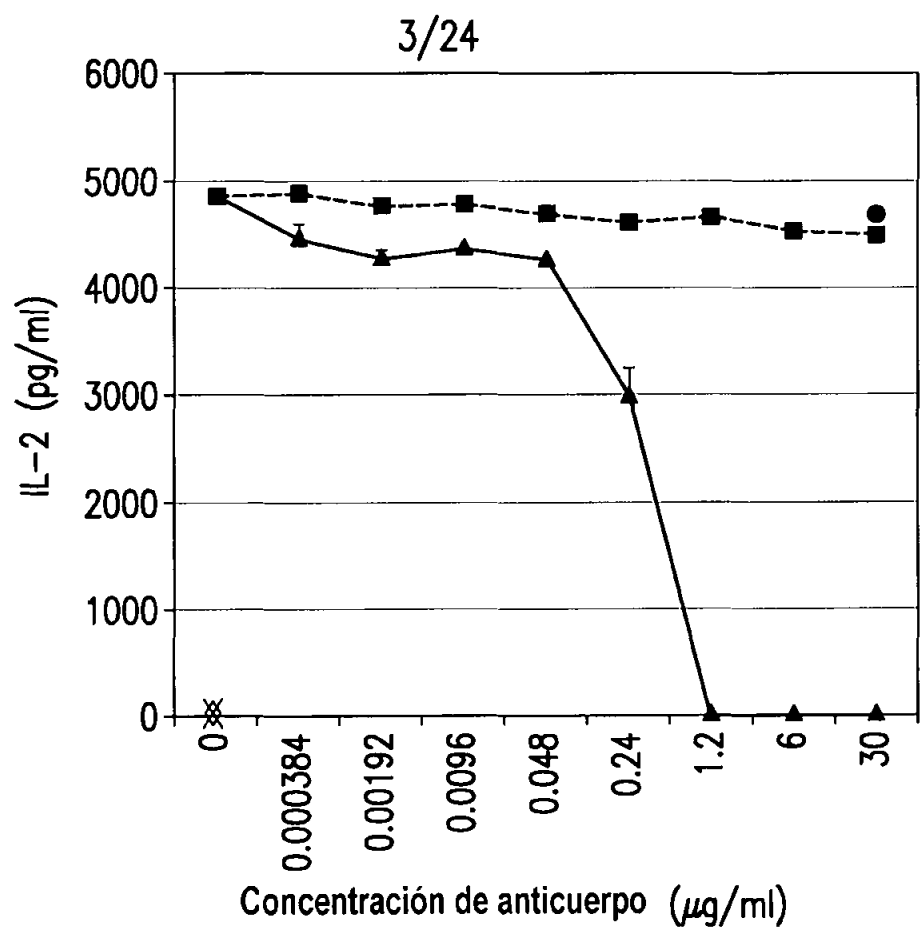


FIG.2A

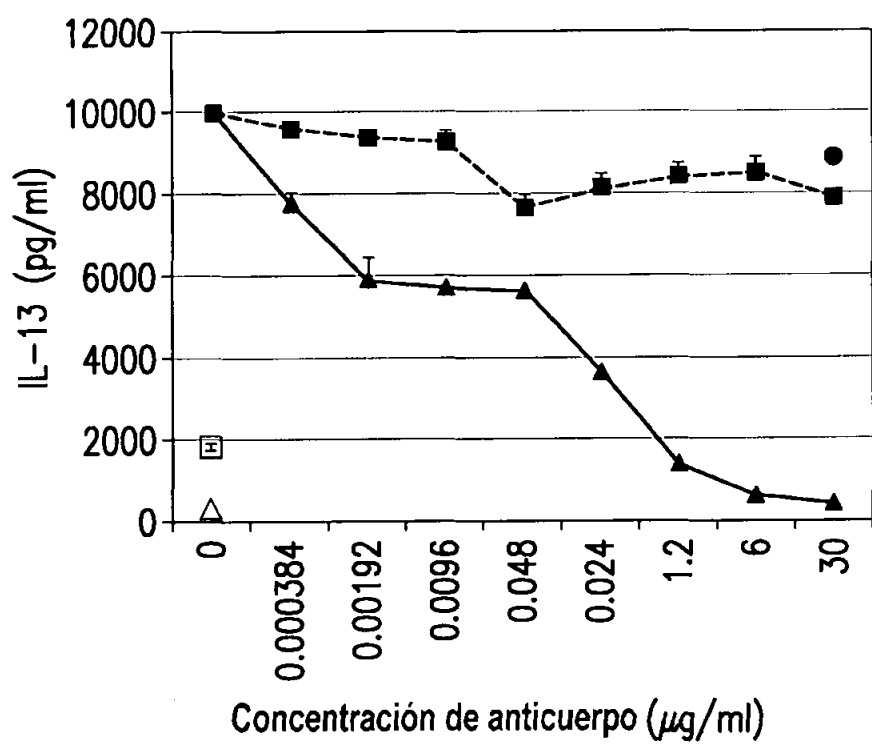


FIG.2B

4/24

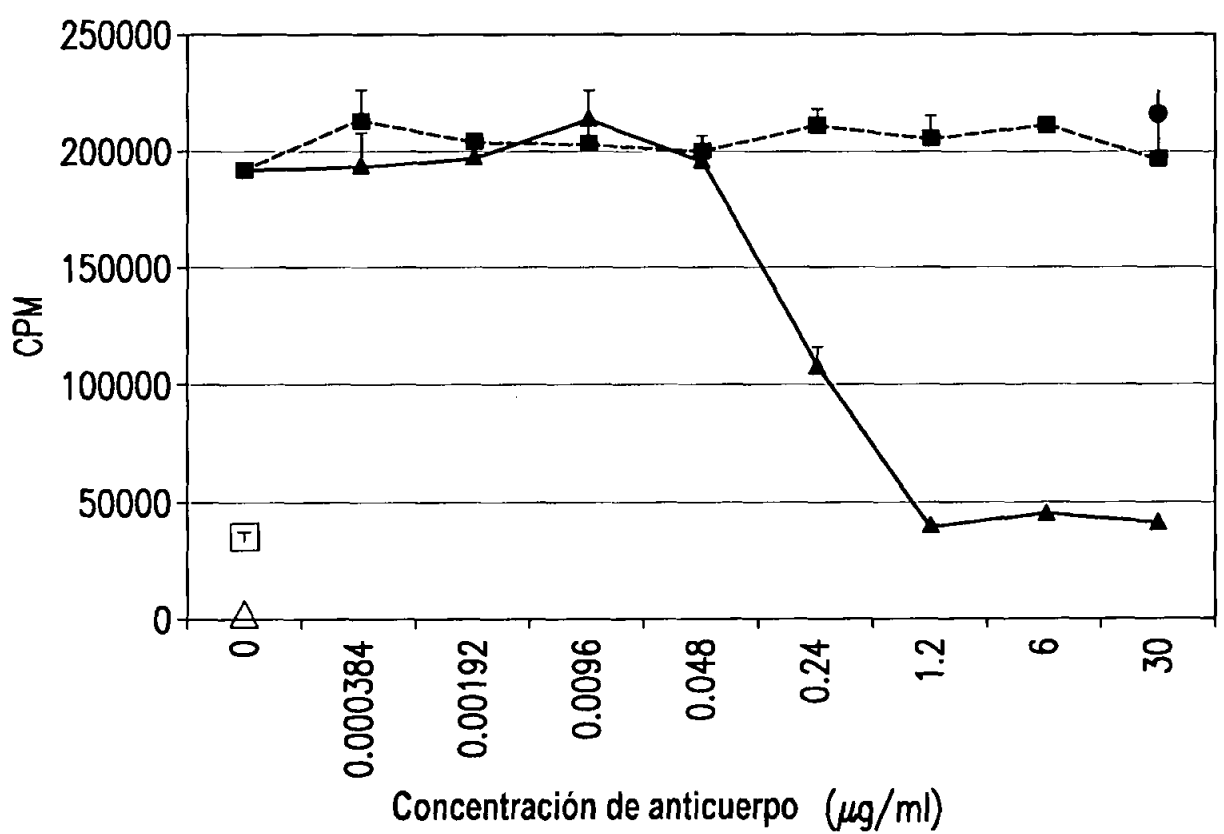


FIG.3

5/24

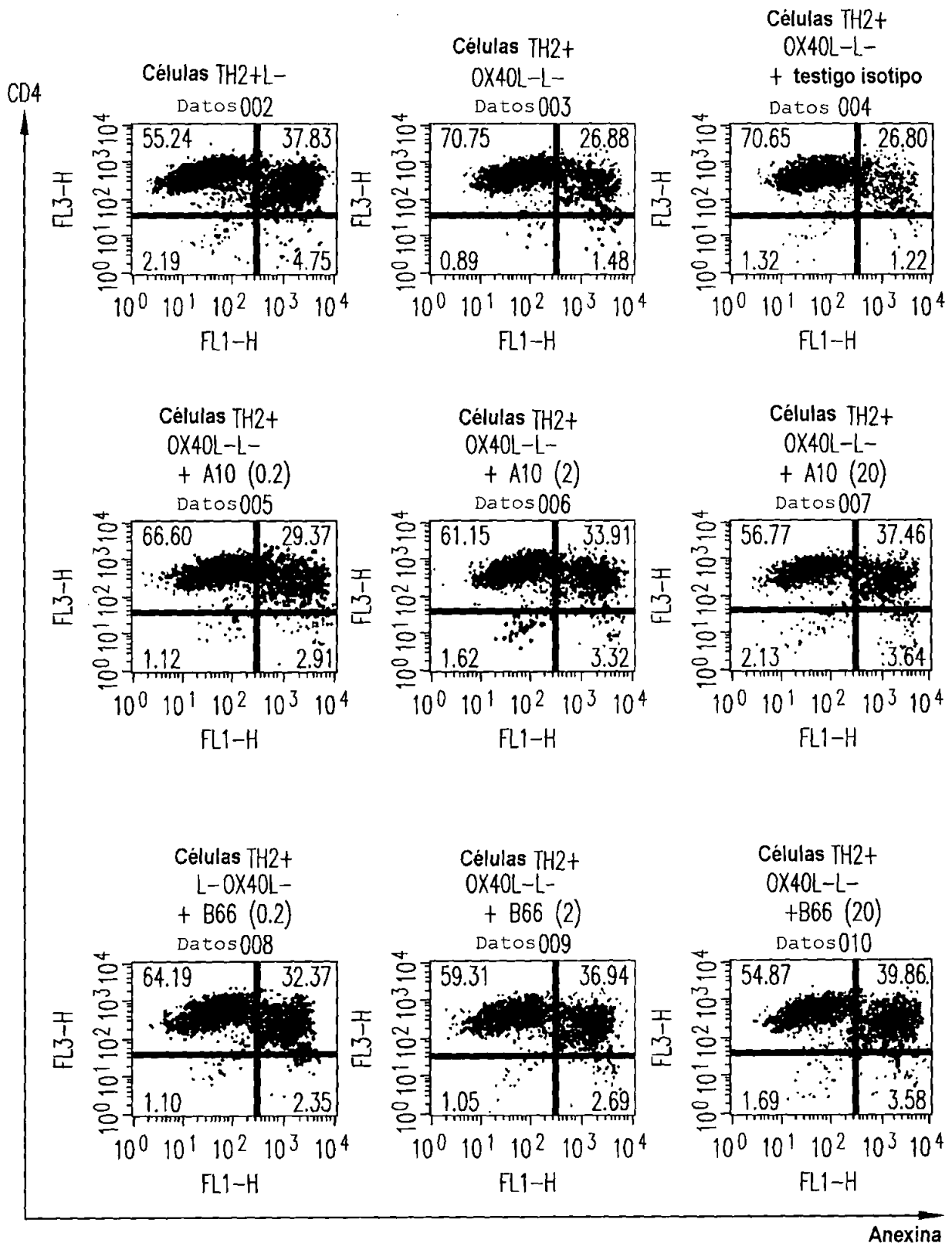


FIG.4

6/24

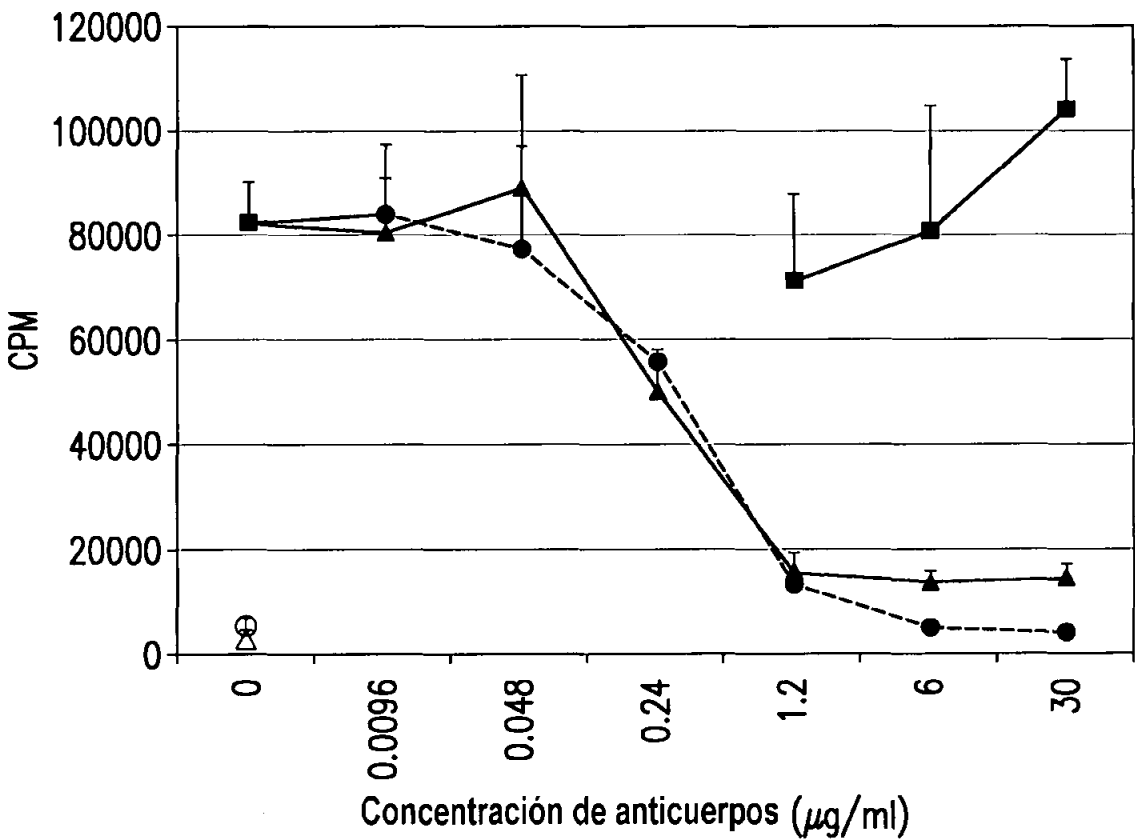


FIG.5

179

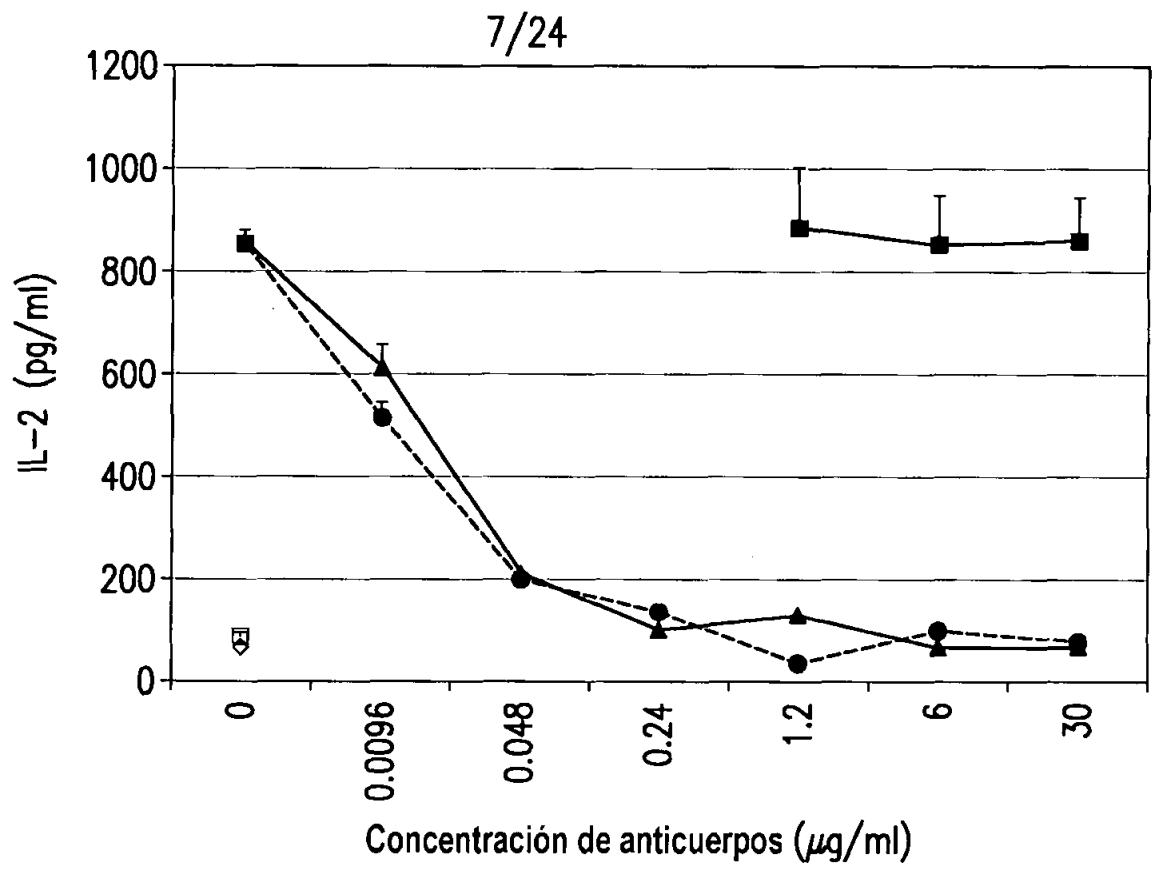
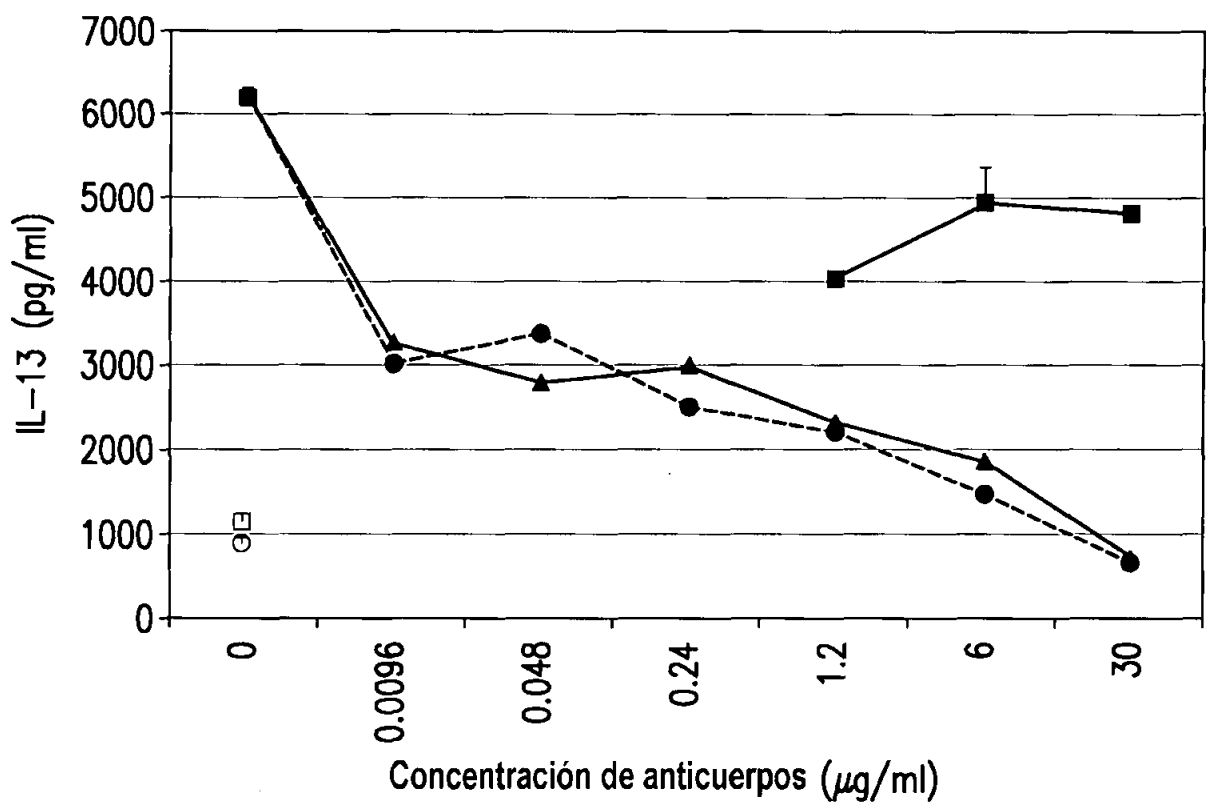


FIG.6A



mAb ($\mu\text{g/ml}$)	0	0.0096	0.048	0.24	1.2	6	30
IL-2 (pg/ml) $\pm$ SD							
Células T CD4 ⁺ naturales + células L	108 $\pm$ 13	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Células T CD4 ⁺ naturales + células L OX40L	2950 $\pm$ 36	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Células T CD4 ⁺ naturales + células L OX40L + testigo de isotipo	2950 $\pm$ 36	NA	3008 $\pm$ 63	3784 $\pm$ 45	3623 $\pm$ 167	3246 $\pm$ 35	3294 $\pm$ 94
Células T CD4 ⁺ naturales + células L OX40L + L106	2950 $\pm$ 36	3038 $\pm$ 31	2553 $\pm$ 48	3751 $\pm$ 210	2850 $\pm$ 246	3250 $\pm$ 175	4012 $\pm$ 145
Células T CD4 ⁺ naturales + células L OX40L + B66	2950 $\pm$ 36	2608 $\pm$ 38	1884 $\pm$ 56	518 $\pm$ 89	0	0	0
IL-13 (pg/ml) $\pm$ SD							
Naïve CD4 ⁺ T cells + L cells	3056 $\pm$ 512	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Naïve CD4 ⁺ T cells + OX40L L cells	5111 $\pm$ 31	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Naïve CD4 ⁺ T cells + OX40L L cells + Isotype Ctrl	5111 $\pm$ 31	NA	6002 $\pm$ 16	5730 $\pm$ 16	5861 $\pm$ 76	5551 $\pm$ 83	5956 $\pm$ 133
Naïve CD4 ⁺ T cells + OX40L L cells + L106	5111 $\pm$ 31	6111 $\pm$ 27	6209 $\pm$ 51	5865 $\pm$ 45	6155 $\pm$ 78	5978 $\pm$ 24	5524 $\pm$ 89
Naïve CD4 ⁺ T cells + OX40L L cells + B66	5111 $\pm$ 31	6499 $\pm$ 69	6188 $\pm$ 81	6105 $\pm$ 42	3990 $\pm$ 44	3306 $\pm$ 30	3505 $\pm$ 4

FIG. 7

	Proliferación (CPM)±SD	IL-2 (pg/ml)±SD	IL-5 (pg/ml)±SD	IL-13 (pg/ml)±SD
NCD4+L-	11167±1399	347±104	215±133	123±9
Células NCD4+OX40-L	85573±18267	1687±609	4671±679	12893±2412
Células NCD4+OX40L-L +A10-D (0.3 µg/ml)	47078±5265	31±118	3634±188	3159±1000
Células NCD4+OX40L-L +A10-D (3 µg/ml)	45535±1508	35±0	750±405	328±176
Células NCD4+OX40L-L +A10-D (30 µg/ml)	49810±1178	15±7	599±384	306±78
Células NCD4+OX40L-L +A10-F (0.3 µg/ml)	59644±8943	799±377	3523±1045	4±1
Células NCD4+OX40L-L +A10-F (3 µg/ml)	45542±4503	16±13	500±71	3±1
Células NCD4+OX40L-L +A10-F (30 µg/ml)	41114±3284	25±0	366±170	1±15
Células NCD4+OX40L-L +CC-A10 (0.3 µg/ml)	48606±10915	919±150	3607±180	4018±2116
Células NCD4+OX40L-L +CC-A10 (3 µg/ml)	44088±2957	7±45	380±190	279±29
Células NCD4+OX40L-L +CC-A10 (30 µg/ml)	36351±4817	4±37	118±59	155±19
Células NCD4+OX40L-L +M-A10 (0.3 µg/ml)	44906±5451	1173±95	4459±110	6642±2186
Células NCD4+OX40L-L +M-A10 (3 µg/ml)	34850±5779	164±81	1230±43	279±47
Células NCD4+OX40L-L +M-A10 (30 µg/ml)	26068±1500	30±15	115±10	15±33
Células NCD4+OX40L-L +IC (0.3 µg/ml)	64307±7992	2110±697	5306±560	16620±5370
Células NCD4+OX40L-L +IC (3 µg/ml)	61848±3138	1634±243	4564±93	13759±3507
Células NCD4+OX40L-L +IC (30 µg/ml)	8014±4731	192±274	5046±42	13347±1511

FIG.8

	Proliferación (CPM)±SD	IL-2 (pg/ml)±SD	IL-5 (pg/ml)±SD	IL-13 (pg/ml)±SD
Células Th1+L	47484±5038	54±8	66.606±0	112±14
Células Th1+OX40L-L	148756±4952	2866±101	454±74	1592±23
Células Th1+OX40L-L +A10-D (0.3 µg/ml)	144222±28812	2209±436	259±116	1638±582
Células Th1+OX40L-L +A10-D (3 µg/ml)	94044±15823	323±80	70±56	312±32
Células Th1+OX40L-L +A10-D (30 µg/ml)	93777±6334	124±18	82±2	256±85
Células Th1+OX40L-L +A10-F (0.3 µg/ml)	12599±15373	1679±109	29±29	1763±116
Células Th1+OX40L-L +A10-F (3 µg/ml)	106887±19132	709±59	55±31	254±96
Células Th1+OX40L-L +A10-F (30 µg/ml)	70287±22237	450±149	47±2	267±42
Células Th1+OX40L-L +CC-A10 (0.3 µg/ml)	131002±8561	2372±128	575±48	1518±544
Células Th1+OX40L-L +CC-A10 (3 µg/ml)	91313±3042	640±103	76±26	467±92
Células Th1+OX40L-L +CC-A10 (30 µg/ml)	79975±14740	150±103	0	163±13
Células Th1+OX40L-L +M-A10 (0.3 µg/ml)	113720±15768	2499±245	253±138	1674±331
Células Th1+OX40L-L +M-A10 (3 µg/ml)	8535±1504	434±31	2±12	358±119
Células Th1+OX40L-L +M-A10 (30 µg/ml)	59326±6261	40±6	0	127±23
Células Th1+OX40L-L +IC (0.3 µg/ml)	140155±9320	4633±467	565±34	2680±150
Células Th1+OX40L-L +IC (3 µg/ml)	151538±5404	3782±406	NA	2512±112
Células Th1+OX40L-L +IC (30 µg/ml)	184029±20195	359±102	335±61	209±252

FIG.9

182

	Proliferación (CPM)±SD	IL-2 (pg/ml)±SD	IL-5 (pg/ml)±SD	IL-13 (pg/ml)±SD
Células Th2+L	1422±1110	313±83	115±11	185±19
Células Th2+OX40L-L	112776±10980	2595±151	2502±145	2565±2794
Células Th2+OX40L-L +A10-D (0.3 µg/ml)	106003±6031	2648±609	1979±160	2866±92
Células Th2+OX40L-L +A10-D (3 µg/ml)	63695±5108	173±22	327±25	207±17
Células Th2+OX40L-L +A10-D (30 µg/ml)	74237±3078	7±1	527±50	267±41
Células Th2+OX40L-L +A10-F (0.3 µg/ml)	108828±11634	1713±299	1488±162	1429±557
Células Th2+OX40L-L +A10-F (3 µg/ml)	70615±21198	64±20	285±63	232±23
Células Th2+OX40L-L +A10-F (30 µg/ml)	56331±6887	0.2	243±102	210±34
Células Th2+OX40L-L +CC-A10 (0.3 µg/ml)	90750±5646	250±476	2149±63	5727±1439
Células Th2+OX40L-L +CC-A10 (3 µg/ml)	68776±6277	353±64	487±184	283±64
Células Th2+OX40L-L +CC-A10 (30 µg/ml)	45627±5067	0	205±73	215±84
Células Th2+OX40L-L +M-A10 (0.3 µg/ml)	103169±9872	2565±534	2103±171	6627±3086
Células Th2+OX40L-L +M-A10 (3 µg/ml)	71706±16730	382±630	393±70	206±19
Células Th2+OX40L-L +M-A10 (30 µg/ml)	42272±5018	14	93±23	185±9
Células Th2+OX40L-L +IC (0.3 µg/ml)	117477±10923	291±359	2616±164	26348±3035
Células Th2+OX40L-L +IC (3 µg/ml)	109960±14213	3418±576	2499±296	24934±3225
Células Th2+OX40L-L +IC (30 µg/ml)	134068±19117	3698±677	2355±75	24880±4694

FIG.10

		Proliferación (CPM)±SD	IL-2 (pg/ml)±SD	IFN- γ (pg/ml)±SD	TNF- α (pg/ml)±SD
CD4+		417±73	218	30	0
CD4+DCs		125462±3065	658±168	780±185	629±32
CD4+DCs+A10-D	(0.6 μ g/ml)	49776±618	0	352±228	465±126
CD4+DCs+A10-D	(6 μ g/ml)	50335±1872	0	402±86	402±51
CD4+DCs+A10-D	(60 μ g/ml)	52114±2401	0	464±9	397±26
CD4+DCs+A10-F	(0.6 μ g/ml)	48628±1352	7±2	584±147	372±11
CD4+DCs+A10-F	(6 μ g/ml)	51290±1686	64	518±90	414±57
CD4+DCs+A10-F	(60 μ g/ml)	49383±1360	0	271±60	353±16
CD4+DCs+CC-A10	(0.6 μ g/ml)	51236±933	37	600±182	357±16
CD4+DCs+CC-A10	(6 μ g/ml)	47832±2016	0	501±208	336±17
CD4+DCs+CC-A10	(60 μ g/ml)	47009±3194	0	144±67	373±40
CD4+DCs+M-A10	(0.6 μ g/ml)	56611±3805	32±31	523±333	384±70
CD4+DCs+M-A10	(6 μ g/ml)	56466±1570	0±0	664±340	386±57
CD4+DCs+M-A10	(60 μ g/ml)	55846±1201	0±0	546±338	378±32
CD4+DCs+IC	(0.6 μ g/ml)	127392±3564	712±213	994±253	543±13
CD4+DCs+IC	(6 μ g/ml)	128305±3274	581±134	867±119	587±36
CD4+DCs+IC	(60 μ g/ml)	119878±12137	537±252	984±242	676±60

12/24

FIG.11

Kabat #	1	10	20	27	27b	27d	29
IGKV4-1	D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
252-B66	D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C	<u>K A S Q T V D Y D G D S Y M H</u>					
252-A10	D I V L T Q S P T S L A V S L G Q R A T I S C	<u>K A S Q S V D Y D G D S Y M N</u>					
Humanizado	D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C	<u>K A S Q T V D Y D G D S Y M H</u>					
A10 (TH)hu336F							CDRL1

Kabat #	35	40	50	60	70
IGKV4-1	W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y	- - - - -	G V P D R F S G S G S G T D F T		
252-B66	W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y	<u>A A S N L E S</u>	G I P A R F S G S G S G T D F T		
252-A10	W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y	<u>A A S N L E S</u>	G I P A R F S G S G S G T D F T		
Humanizado	W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y	<u>A A S N L E S</u>	G V P D R F S G S G S G T D F T		
A10 (TH)hu336F			CDR-L2		

Kabat #	75	80	90	100	106a
IGKV4-1/IGKJ1	L T I S S L Q A E D V A V Y Y C	- - - - -	- - - - -	F G Q G T K V E I K	(SEQ ID NO: 28)
252-B66	L N I H P V E E E D A A T Y Y C	<u>Q Q S N E D P Y T</u>	F G G G T K L E I K	(SEQ ID NO: 7)	
252-A10	L N I H P V E E E D A T T Y Y C	<u>H Q S N E D P W T</u>	F G G G T K L E I K	(SEQ ID NO: 8)	
Humanizado	L T I S S L Q A E D V A V Y Y C	<u>H Q S N E D P W T</u>	F G Q G T K V E I K	(SEQ ID NO: 9)	
A10 (TH)hu336F			CDRL3		

13/24

FIG. 12A

Número de Kabat	1	10	20	30	36																																
252-A10	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	S	V	L	V	R	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>M</u>	<u>H</u>	<u>W</u>	<u>V</u>
IGHV1-46	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	-	-	-	-	-	W	V
Humanizado	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>M</u>	<u>H</u>	<u>W</u>	<u>V</u>
A10 (TH)hu336F	CDR-H1																																				

Número de Kabat	40	50	52a	54	60	66	70																															
252-A10	K	Q	R	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>H</u>	<u>P</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	R	A	T	L	T	V	D	T	
IGHV1-46	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	V	T	M	T	R	D	T
Humanizado	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>H</u>	<u>P</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	R	V	T	M	T	R	D	T	
A10 (TH)hu336F	CDR-H2																																					

Número de Kabat	80	82	82b	83	90	100	100b	101																											
252-A10	S	S	S	T	A	Y	V	D	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>F</u>	<u>W</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>
IGHV1-46	S	T	S	T	V	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Humanizado	S	T	S	T	V	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>F</u>	<u>W</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>
A10 (TH)hu336F	CDR-H3																																		

Número de Kabat	110	113										
252-A10	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A	(SEQ ID NO: 10)
IGHJ4	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(SEQ ID NO: 29)
Humanizado	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(SEQ ID NO: 11)
A10 (TH)hu336F												

FIG.12B

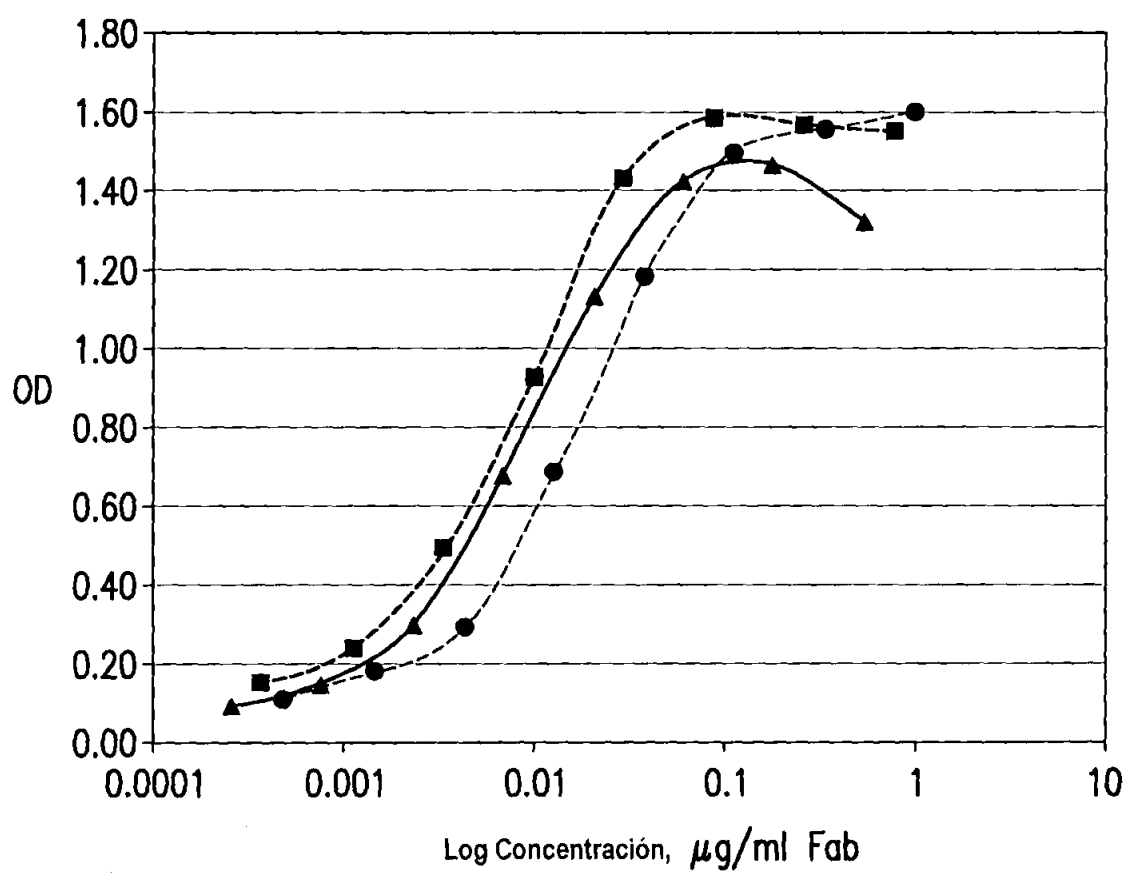


FIG.13

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAACCTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGG
TGATAGTTATATGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGT
TTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTACAACCTATTACTGTCACCAGAGTAATGAGGAT
CCGTGGACGTTCTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:20)

FIG.14A

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAACTGTTGATTATGATGG
TGACAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGT
TTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGAT
CCGTACACGTTCTGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:21)

FIG.14B

GACATCGTGATGACCCAGAGCCCAGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGCGCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGGACTIONACGACGGC
GACAGCTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGCCACCAAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAACCTGGAGAGCGGCGTGCCAGACCGCTTC
AGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCACCAGAGCAACGAGGACCCA
TGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG (SEQ ID NO:22)

FIG.14C

GACATCGTGATGACCCAGAGCCCAGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGCGCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGGACTIONACGACGGC
GACAGCTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGCCACCAAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAACCTGGAGAGCGGCGTGCCAGACCGCTTC
AGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCACCAGAGCAACGAGGACCCA
TGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG (SEQ ID NO:23)

FIG.14D

GACATCGTGATGACCCAGAGCCCAGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGCGCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGGACTIONACGACGGC
GACAGCTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGCCACCAAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAACCTGGAGAGCGGCGTGCCAGACCGCTTC
AGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCACCAGAGCAACGAGGACCCA
TGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG (SEQ ID NO:24)

FIG.14E

CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGTCTGTGCTGGTGAGGCCTGGAGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGG
ATGCATTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTCATCCTAAAAGTGGTAATAGTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGC
AGGGCCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACGTGGATCTTAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGGT
CCGGAATATAGTAATTTTTGGTTTGCTTATTGGGGCCAAGGAACCTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO:25)

FIG.14F

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGG
ATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCAGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGAGATCCACCCAAAGAGCGGCAACAGCAACTACAACGAGAAGTTCAAGGGC
CGCGTGACCATGACCCGCGACACCAGCACCAGCACCCTGTACATGGAGCTGAGCAGCCTGCGCAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGCGGC
CCAGAGTACAGCAACTTCTGGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO:26)

FIG.14G

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGG
ATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCAGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGAGATCCACCCAAAGAGCGGCAACAGCAACTACAACGAGAAGTTCAAGGGC
CGCGTGACCCTGACCCGCGACACCAGCACCAGCACCCTGTACATGGAGCTGAGCAGCCTGCGCAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGCGGC
CCAGAGTACAGCAACTTCTGGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO:27)

FIG.14H

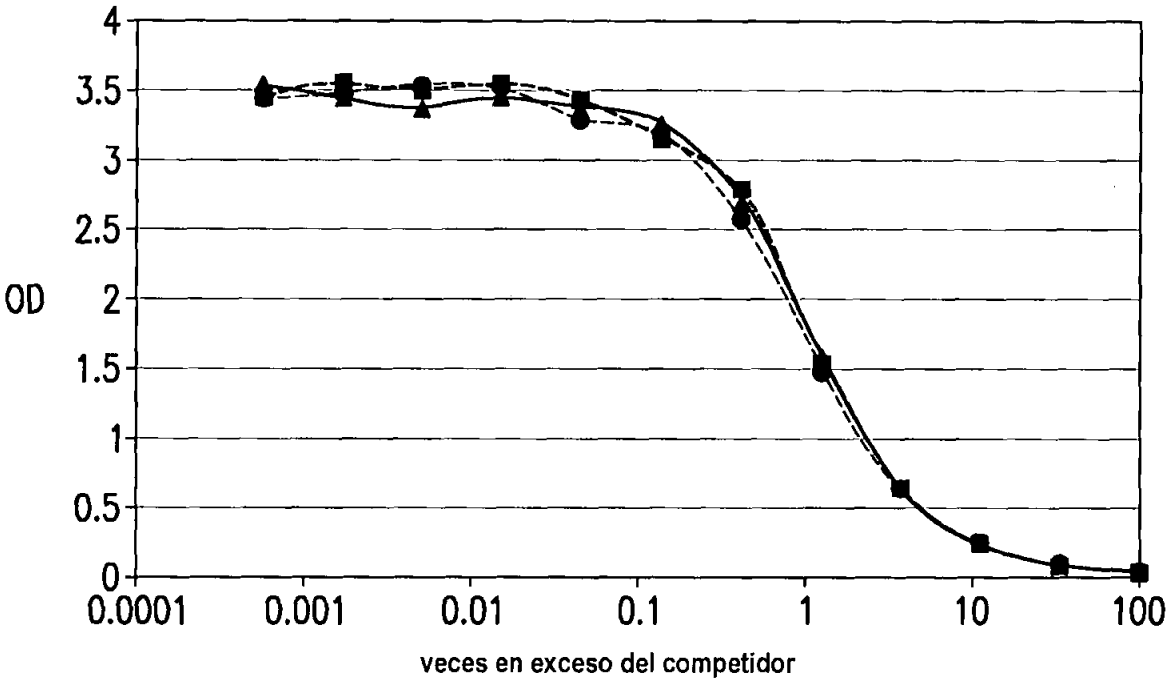


FIG.15

I			
A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	-HI-	WVRQAPGQGLEWMG
B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-HI-	WVRQAPGQGLEWM
C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-HI-	WVRQAPGQGLEWM
D	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-HI-	WVRQAPGQGLEWM
II			
A	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSVS	-HI-	
B	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-HI-	WIRQPPGKGLEWIG
C	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-HI-	WIRQPPGKGLEWI
D	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-HI-	WIRQPPGKGLEWI
III			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-HI-	WVRQAPGKGLEWVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV
Acceptor			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-HI-	WVRQAPGKGLEWVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV
Second Acceptor			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-HI-	WVRQAPGKGLEWVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV

19/24

191

FIG.16A

H2-	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:30
H2-	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:31
H2-	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA	-H3-	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:32
H2-	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	-H3-	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:33
H2-	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:34
H2-	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:35
H2-	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA	-H3-	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:36
H2-	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC	-H3-	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:37
H2-	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:38
H2-	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:39
H2-	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:40
H2-	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:41
H2-	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR	-H3-	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:42
H2-	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR	-H3-	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:43
H2-	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS	-H3-	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:44
H2-	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:45
H2-	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:46
H2-	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:47
H2-	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:48

FIG.16B

20/24

192

kv1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C -L1- W Y Q Q K P G K A P K L L I Y -L2-
kv2 D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C -L1- W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y -L2-
kv3 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C -L1- W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y -L2-
kv4 D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C -L1- W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y -L2-

FIG.17A

21/24

GVP S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C -L3- F G Q G T K V E I K SEQ ID NO:49
GVP D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C -L3- F G Q G T K V E I K SEQ ID NO:50
G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C -L3- F G Q G T K V E I K SEQ ID NO:51
GVP D R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C -L3- F G Q G T K V E I K SEQ ID NO:52

22/24

FIG.17B

194

Secuencias de estructura de cadena ligera huMAb4D5-8

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
 Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO:53)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹ (SEQ ID NO: 54)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸ (SEQ ID NO: 55)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO:56)

Secuencias de estructura de cadena pesada huMAb4D5-8

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO:57)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸ (SEQ ID NO:58)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn⁸³
 Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹² (SEQ ID NO:59)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO:60)

23/24

FIG.18

Secuencias de estructura de cadena ligera huMAb4D5-8 modificada en posición 66 (subrayado)

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO:53)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹ (SEQ ID NO: 54)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸ (SEQ ID NO: 55)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO:56)

Secuencias de estructura de cadena pesada huMAbD5-8 modificada en posiciones 71, 73 y 78 (subrayado)

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO:57)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸ (SEQ ID NO:58)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn⁸³
Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹² (SEQ ID NO:59)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO:60)

197

Lista de Secuencias - 111299

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Tanox, Inc.
LAMHAMEDI-CHERRADI, Salah-Eddine
YAO, Zhengbin
SINGH, Sanjaya

<120> ANTICUERPOS OX40 ANTAGONISTAS Y SU USO
EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS Y AUTOINMUNES

<130> 12279-205-228

<140> Unknown

<141>

<150> 60/903,693

<151> 2007-02-27

<160> 60

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1084

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
cgaggatgtg cgtgggggct cggcggctgg gccgcggggc gtgtgcggct ctgctcctcc 60
tgggcctggg gctgagcacc gtgacggggc tccactgtgt cggggacacc taccacagca 120
acgaccggtg ctgccacgag tgcaggccag gcaacgggat ggtgagccgc tgcagccgct 180
cccagaacac ggtgtgccgt ccgtgcgggc cgggcttcta caacgacgtg gtcagctcca 240
agccgtgcaa gccctgcacg tgggtgaacc tcagaagtgg gagtgagcgg aagcagctgt 300
gcacggccac acaggacaca gtctgccgct gccgggcggg caccagccc ctggacagct 360
acaagcctgg agttgactgt gccccctgcc ctccagggca cttctcccca ggcgacaacc 420
aggcctgcaa gccctggacc aactgcacct tggctgggaa gcacaccctg cagccggcca 480
gcaatagctc ggacgcaatc tgtgaggaca gggaccccc agccacgcag cccaggaga 540
cccaggggcc cccggccagg cccatcactg tccagcccac tgaagcctgg ccagaaacct 600
cacagggacc ctccacccgg cccgtggagg tccccggggg ccgtgcgggt gccgcatcc 660
tgggcctggg cctggtgctg gggctgctgg gccccctggc catcctgctg gccctgtacc 720
tgctccggag ggaccagagg ctgcccccg atgcccacaa gccccctggg ggaggcagtt 780
tccggacccc catccaagag gagcaggccg acgcccactc caccctggcc aagatctgac 840
ctgggcccac caaggtggac gctgggcccc gccaggctgg agcccggagg gtctgctggg 900
cgagcagggc aggtgcaggc cgcctgcccc gccacgctcc tgggccaact ctgcaccgtt 960
ctaggtgccg atggctgcct ccggctctct gcttacgtat gccatgcata cctcctgccc 1020
cgcgggacca caataaaaac cttggcagac gggagtctcc gaccggcaaa aaaaaaaaaa 1080
aaaa 1084
```

<210> 2

<211> 277

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```
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
```

Lista de Secuencias - 111299
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> 3
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> OLIGONUCLEOTIDE PRIMER FOR OX40

<400> 3
cccaagcttt accccagcaa cgaccggtgc tgc 33

<210> 4
<211> 29
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> OLIGONUCLEOTIDE PRIMER FOR OX40

<400> 4
cgcttcgagg acctccacgg gccgggtgg 29

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> OLIGONUCLEOTIDE PRIMER FOR OX40

<400> 5
caccatgtgc gtgggggctc ggcggctggg 30

<210> 6
<211> 31
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> OLIGONUCLEOTIDE PRIMER FOR OX40

<400> 6
gatcttggcc aggggtggagt gggcgctcggc c 31

<210> 7
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

Lista de Secuencias - 111299

<223> Región variable de la cadena ligera de murino anti-OX40 anticuerpo B66

<400> 7

```

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

```

<210> 8

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera de murino anti-OX40 anticuerpo A10

<400> 8

```

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

```

<210> 9

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera de humanizado anti-OX40 anticuerpo A10LC(TH)hu336

<400> 9

```

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

```

Lista de Secuencias - 111299

<210> 10
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de la cadena pesada de murino anti-OX40 anticuerpo A10

<400> 10
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Val Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile His Pro Lys Ser Gly Asn Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Val Asp Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Pro Glu Tyr Ser Asn Phe Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 11
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de la cadena pesada de humanizado anti-OX40 anticuerpo A10LC(TH)hu336

<400> 11
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Glu Ile His Pro Lys Ser Gly Asn Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Pro Glu Tyr Ser Asn Phe Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR-L1 OF murino anti-OX40 anticuerpo B66

<400> 12
 Lys Ala Ser Gln Thr Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met His
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 7

Lista de Secuencias - 111299

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR-L2 OF anti-OX40 anticuerpo A10 AND B66

<400> 13

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR-L3 OF anti-OX40 anticuerpo B66

<400> 14

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR-L1 OF anti-OX40 anticuerpo A10

<400> 15

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR-L3 OF anti-OX40 anticuerpo A10

<400> 16

His Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp Thr
1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR-H1 OF anti-OX40 anticuerpo A10 AND B66

<400> 17

Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR-H2 OF anti-OX40 anticuerpo A10 AND B66

<400> 18

Glu Ile His Pro Lys Ser Gly Asn Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15 20 25 30

Lista de Secuencias - 111299

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera de humanizado anti-OX40 anticuerpo A10A & A10D

<400> 23

```
gacatcgtga tgacccagag cccagacagc ctggccgtga gcctgggcca ggcgcgccacc 60
atcaactgca aggccagcca gagcgtggac tacgacggcg acagctacat gcactggtac 120
cagcagaagc caggccagcc accaaagctg ctgatctacg ccgccagcaa cctggagagc 180
ggcgtgccag accgcttcag cggcagcggc agcggcaccg acttcaccct gaccatcagc 240
agcctgcagg ccgaggacgt ggccgtgtac tactgccacc agagcaacga ggacccatgg 300
accttcggcc agggcaccaa ggtggagatc aag 333
```

<210> 24

<211> 333

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera de humanizado anti-OX40 anticuerpo A10(TH)HU336F & A10C

<400> 24

```
gacatcgtga tgacccagag cccagacagc ctggccgtga gcctgggcca ggcgcgccacc 60
atcaactgca aggccagcca gagcgtggac tacgacggcg acagctacat gcactggtac 120
cagcagaagc caggccagcc accaaagctg ctgatctacg ccgccagcaa cctggagagc 180
ggcgtgccag accgcttcag cggcagcggc agcggcaccg acttcaccct gaccatcagc 240
agcctgcagg ccgaggacgt ggccgtgtac tactgccacc agagcaacga ggacccatgg 300
accttcggcc agggcaccaa ggtggagatc aag 333
```

<210> 25

<211> 360

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena pesada de murino anti-OX40 anticuerpo A10

<400> 25

```
caggtccaac tgcagcagcc tgggtctgtg ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcattgggt gaagcagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gattggagag attcatccta aaagtggtaa tagtaactac 180
aatgagaagt tcaagggccg ggccacactg actgtagaca catcctccag cacagcctac 240
gtggatctta gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagggtccg 300
gaatatagta atttttggtt tgcttattgg ggccaaggaa ctctggtcac tgtctctgca 360
```

<210> 26

<211> 360

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena pesada de humanizado anti-OX40 anticuerpo A10(TH)HU336F & A10D & A10E

<400> 26

```
caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaagc caggcgccag cgtgaagggtg 60
agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctactgga tgcattgggt gcgccaggcc 120
ccaggccagg gccttgagtg gatgggcgag atccaccca agagcggaag cagcaactac 180
aacgagaagt tcaagggccg cgtgaccatg acccgcgaca ccagcaccag caccgtgtac 240
atggagctga gcagcctgcg cagcagggac accgcggtgt actactgcgc ccgcggccca 300
gagtacagca acttctggtt cgcctactgg ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc 360
```

<210> 27

<211> 360

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

Lista de Secuencias - 111299

<220>

<223> Región variable de la cadena pesada de humanizado anti-ox40 anticuerpo A10L70 & A10A-C

<400> 27

```
cagggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaagc caggcgccag cgtgaagggtg 60
agctgcaagg ccagcggcta caccitcacc agctactgga tgcactgggt gcgccaggcc 120
ccaggccagg gcctggagtg gatgggagcag atccacccaa agagcggcaa cagcaactac 180
aacgagaagt tcaagggccg cgtgaccctg acccgcgaca ccagcaccag caccgtgtac 240
atggagctga gcagcctgcg cagcgaggac accgccgtgt actactgctc ccgcggccca 300
gagtacagca acttctggtt cgcctactgg ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc 360
```

<210> 28

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 35, 36, 37, 38, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101

<223> Xaa = Any Amino Acid

<220>

<223> Plantilla humana variable de la cadena ligera IGKV4-1/IGKJ1

<400> 28

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

<210> 29

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> 31, 32, 33, 34, 35, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109

<223> Xaa = Any Amino Acid

<220>

<223> Human Template Heavy Chain Region IGHV1-45/IGHJ4

<400> 29

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Xaa Xaa
 20      25      30
Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35      40      45
Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50      55      60
Xaa Xaa Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65      70      75      80
```

Lista de Secuencias - 111299

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90
 Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 30
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59,
 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 103, 104, 105,
 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117,
 118, 119, 120, 121
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<220>
 <223> HEAVY CHAIN FRAMEWORK REGION

<400> 30
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Met Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
 65 70 75 80
 Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 85 90 95
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130

<210> 31
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 51, 52, 53,
 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67,
 68, 69, 70, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111,
 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<220>
 <223> HEAVY CHAIN FRAMEWORK REGION

<400> 31
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Met Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
 65 70 75 80

Lista de Secuencias - 111299

Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala
				85					90					95	
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			100					105					110		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
		115					120					125			
Thr	Val	Ser	Ser												
	130														

<210> 32
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 51, 52, 53,
 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67,
 68, 69, 70, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110,
 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<220>
 <223> HEAVY CHAIN FRAMEWORK REGION

<400> 32

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

<210> 33
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 51, 52, 53,
 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67,
 68, 69, 70, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109,
 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<220>
 <223> HEAVY CHAIN FRAMEWORK REGION

<400> 33

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
		20					25						30		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu
		35				40					45				
Trp	Met	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
	50				55				60						

Lista de Secuencias - 111299

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr
65					70					75					80
Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala
				85					90					95	
Val	Tyr	Tyr	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			100					105					110		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
		115					120					125			
Thr	Val	Ser	Ser												
	130														

<210> 34
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<220>
 <223> HEAVY CHAIN FRAMEWORK REGION

<400> 34

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

<210> 35
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<220>
 <223> HEAVY CHAIN FRAMEWORK REGION

<400> 35

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			20					25					30		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu

Lista de Secuencias - 111299

	35		40		45										
Trp	Ile	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
	50					55				60					
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys
65					70				75					80	
Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala
				85					90					95	
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			100					105						110	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			115				120					125			
Thr	Val	Ser	Ser												
	130														

<210> 36
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 51, 52, 53,
 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67,
 68, 69, 70, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110,
 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<220>
 <223> HEAVY CHAIN FRAMEWORK REGION

<400> 36

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

<210> 37
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 51, 52, 53,
 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67,
 68, 69, 70, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109,
 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<220>
 <223> HEAVY CHAIN FRAMEWORK REGION

<400> 37

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

Lista de Secuencias - 111299

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

<210> 38
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<220>
 <223> HEAVY CHAIN FRAMEWORK REGION

<400> 38																
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Xaa	Xaa	
			20					25					30			
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	
		35					40					45				
Trp	Val	Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
	50					55					60					
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	
65					70					75				80		
Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	
				85					90				95			
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			100					105					110			
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
		115				120						125				
Thr	Val	Ser	Ser													
	130															

<210> 39
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<220>

Lista de Secuencias - 111299

<223> HEAVY CHAIN FRAMEWORK REGION

<400> 39

```

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

```

<210> 40

<211> 132

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> VARIANT

<222> 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 51, 52, 53,
54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67,
68, 69, 70, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110,
111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121

<223> Xaa = Any Amino Acid

<220>

<223> HEAVY CHAIN FRAMEWORK REGION

<400> 40

```

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

```

<210> 41

<211> 132

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> VARIANT

<222> 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 51, 52, 53,
54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67,
68, 69, 70, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109,

Lista de Secuencias - 111299
 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<220>
 <223> HEAVY CHAIN FRAMEWORK REGION

<400> 41
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 65 70 75 80
 Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 85 90 95
 Val Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130

<210> 42
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59,
 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 103, 104, 105,
 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117,
 118, 119, 120, 121
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<220>
 <223> HEAVY CHAIN FRAMEWORK REGION

<400> 42
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 65 70 75 80
 Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 85 90 95
 Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130

<210> 43
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANT

Lista de Secuencias - 111299
 <222> 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 51, 52, 53,
 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67,
 68, 69, 70, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111,
 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<220>
 <223> HEAVY CHAIN FRAMEWORK REGION

<400> 43
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 65 70 75 80
 Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 85 90 95
 Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130

<210> 44
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 51, 52, 53,
 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67,
 68, 69, 70, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110,
 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<220>
 <223> HEAVY CHAIN FRAMEWORK REGION

<400> 44
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 65 70 75 80
 Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 85 90 95
 Val Tyr Tyr Cys Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130

<210> 45
 <211> 132
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<221> VARIANT

<223> Xaa = Any Amino Acid

<220>

<223> HEAVY CHAIN FRAMEWORK REGION

<400> 45

[illegible]

<210> 46

<211> 132

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<221> VARIANT

<223> Xaa = Any Amino Acid

$\langle 220 \rangle$

<223> HEAVY CHAIN FRAMEWORK REGION

<400> 46

[illegible]

Lista de Secuencias - 111299

<210> 47
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 51, 52, 53,
 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67,
 68, 69, 70, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110,
 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<220>
 <223> HEAVY CHAIN FRAMEWORK REGION

<400> 47
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 65 70 75 80
 Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 85 90 95
 Val Tyr Tyr Cys Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130

<210> 48
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 51, 52, 53,
 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67,
 68, 69, 70, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109,
 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<220>
 <223> HEAVY CHAIN FRAMEWORK REGION

<400> 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 65 70 75 80
 Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 85 90 95
 Val Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

Lista de Secuencias - 111299

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130

<210> 49
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 24, 40
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<220>
 <223> marco de la región de la cadena ligera

<400> 49
 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 Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 20 25 30
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 35 40 45
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 50 55 60
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys

<210> 50
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> marco de la región de la cadena ligera

<400> 50
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 20 25 30
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 35 40 45
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp
 50 55 60
 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 65 70 75 80

<210> 51
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> marco de la región de la cadena ligera

<400> 51
 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 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 20 25 30
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 35 40 45
 Ser Gly Thr Asn Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asn

Lista de Secuencias - 111299

50 55 60
Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
65 70 75 80

<210> 52
<211> 80
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> marco de la región de la cadena ligera

<400> 52
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
20 25 30
Pro Lys Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
35 40 45
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp
50 55 60
Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
65 70 75 80

<210> 53
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> marco de la región de la cadena ligera

<400> 53
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
20

<210> 54
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> marco de la región de la cadena ligera

<400> 54
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 55
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> marco de la región de la cadena ligera

<400> 55
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 56
<211> 10
<212> PRT

Lista de Secuencias - 111299

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de la región de la cadena ligera

<400> 56

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 57

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de la región de la cadena ligera

<400> 57

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de la región de la cadena ligera

<400> 58

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 59

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de la región de la cadena ligera

<400> 59

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

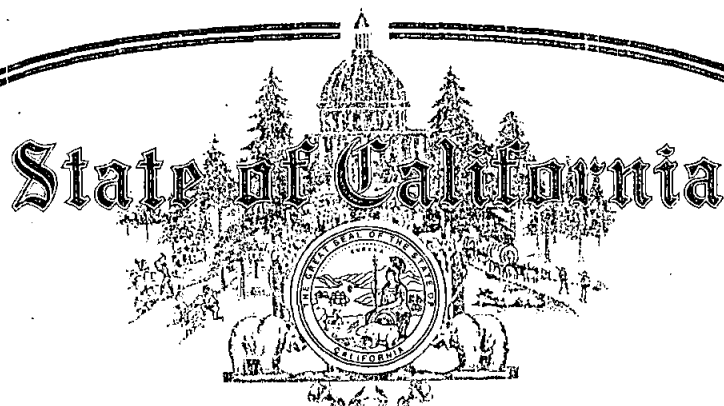
<220>

<223> marco de la región de la cadena ligera

<400> 60

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

AS: 99908P



SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

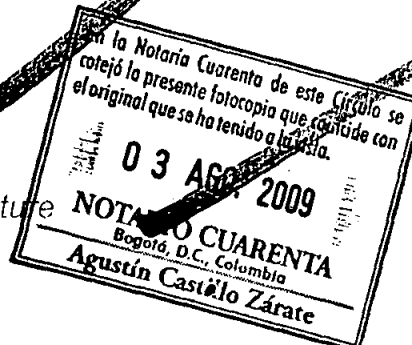
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by AIDA MICLAT GUIAM
3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
4. bears the seal/stamp of AIDA MICLAT GUIAM, Notary Public,
State of California

CERTIFIED

5. At Sacramento, California
6. the 15th day of December 2005
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 267083
9. Seal/Stamp:

10. Signature



[Signature]

Secretary of State



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of

San Mateo

ss.

On

December 6, 2005

Date

before me,

Aida Miclat Guiam

Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")

personally appeared

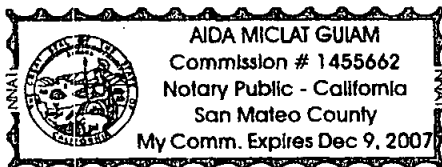
Timothy R. Schwartz

Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me

☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



WITNESS my hand and official seal.

[Signature]

Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document:

Document Date:

Number of Pages:

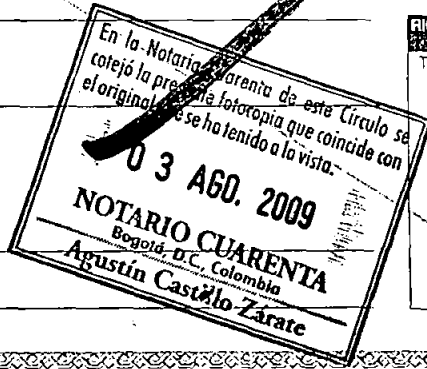
Signer(s) Other Than Named Above:

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name:

- ☐ Individual
- ☐ Corporate Officer — Title(s):
- ☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
- ☐ Attorney-in-Fact
- ☐ Trustee
- ☐ Guardian or Conservator
- ☐ Other:

Signer Is Representing:



RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER

Top of thumb here

PODER

POWER OF ATTORNEY

nosotros)

I (We)

Genentech, Inc.

1 DNA Way

ciliado(s) en

domiciled in

South San Francisco, California 94080-4990
USA

bro(amos) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO
BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO
TMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, de Bogotá,
mbia, apoderados verdaderos y legales con poder
cial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y
ridades colombianas administrativas, judiciales y de
ía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de
ntes de invención, registros de marcas, diseños
stiales, modelos de utilidad, depósitos de nombres
erciales y enseñas, registros de derechos de autor y
ratos sobre los mismos, obtención de certificados de
ntor de variedades vegetales, así como sus prórrogas,
vaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre
domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de
cia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como
andante o como demandado en cualquier instancia y
rso ante cualquier juez, corporación, funcionario público
toridad en acciones judiciales, administrativas y de
ía tales como: oposiciones al registro de marcas;
ones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones
ndicatorias, acciones derivadas de la obtención o
otación de licencias; acciones de competencia desleal;
andas penales; acciones de indemnización de
jicios, reclamos y observaciones a solicitudes de
ntes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el
cicio de medidas cautelares y en otras acciones o
lidas similares.

Hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO
and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H.
PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, of
Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with
special, ample and sufficient power to obtain from the
Colombian administrative, judicial and police offices and
authorities, in any instance, privileges of patents of
invention, registration of trademarks, industrial designs and
utility models; registration of commercial names and
emblems, registration of copyright and contracts related
thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as
well as extensions, renewals and recordal of assignments
and changes of name and domicile related to the above; to
prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act
as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and
before any judge, corporation, public official or authority in
judicial, administrative and police actions, such as:
oppositions to the registration of trademarks; caducity,
cancellation and nullity actions; claim actions derived from
the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair
competition; criminal proceedings, actions for payment of
damages: claims or observations on patent applications,
models, industrial designs and utility models; in the exercise
of preventive measures and in other actions or similar
proceedings.

ste efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes,
ular descripciones, enmiendas, protestas,
araciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades,
laciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y
ámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a
chos concedidos o en curso de concesión; recibir toda
e de documentos y valores, dando el descargo
ectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades
s los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas
medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis
estros intereses), con todas las demás facultades legales
esarias.

To that effect they hereby empowered to file applications,
formulate descriptions, amendments, protests, declarations,
oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to
pay taxes, quotas and assessments prescribed by law,
renounce or waive the rights granted or in the process of
granting; to receive all kinds of documents and valuables,
giving the respective release of receipt, and, in general, to
take before said authorities the necessary steps to such
effect, and any measures that they may deem pertinent to
the safeguard of my (our) interest(s) with all the other
necessary legal powers.

este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en
(nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de
desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en
parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos)
JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ
JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o
ECTOR GOMEZ MEJIA, domiciliado(s) en la Carrera 7
16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia,
con facultades para recibir notificaciones y designar
apoderados judiciales o extrajudiciales.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist,
settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute
this power in whole or in part and to revoke substitutions. At
the same time I (We) hereby appoints JUAN PABLO
CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO
and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR
GOMEZ MEJIA, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9,
my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive
notifications and to designate judicial and extrajudicial
attorneys.

orgado y firmado en

South San Francisco, California
USA

de de

Granted and signed in

day of December 2005

na

mbre
rgo



Signature

Name

Title

Timothy R. Schwartz, Ph.D.

Section Patent Counsel

Authorized Corporate Signatory

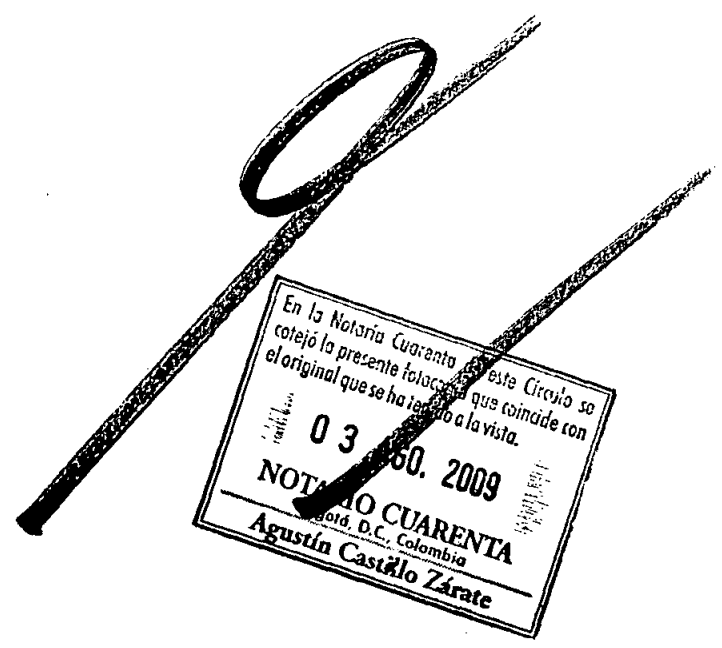
Genentech, Inc.

AUTHORIZATION

Genentech, Inc. hereby authorizes any of Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec and Timothy R. Schwartz, for so long as they remain employees of Genentech, Inc., to execute, on its behalf, any submissions associated with the filing, prosecution, granting, and extension and maintenance of grant of patent and trademark applications in the U.S. and foreign countries, contracts relating to biological deposits with the American Type Culture Collection, and assignments to publishers of copyrights covering works authored by Genentech employees.

August 27, 2002
Dated

Sean Johnston
Sean A. Johnston
Vice President, Intellectual Property
Genentech, Inc.



222

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por **Genentech, Inc.** domiciliada en **1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, Estados Unidos de América.**

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

- 1. País: Estados Unidos de América
- Esta documento público
- 2. ha sido firmado por AIDA MICLAT GUIAM
- 3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
- 4. lleva el sello/timbre de AIDA MICLAT GUIAM, Notario Público Estado de California

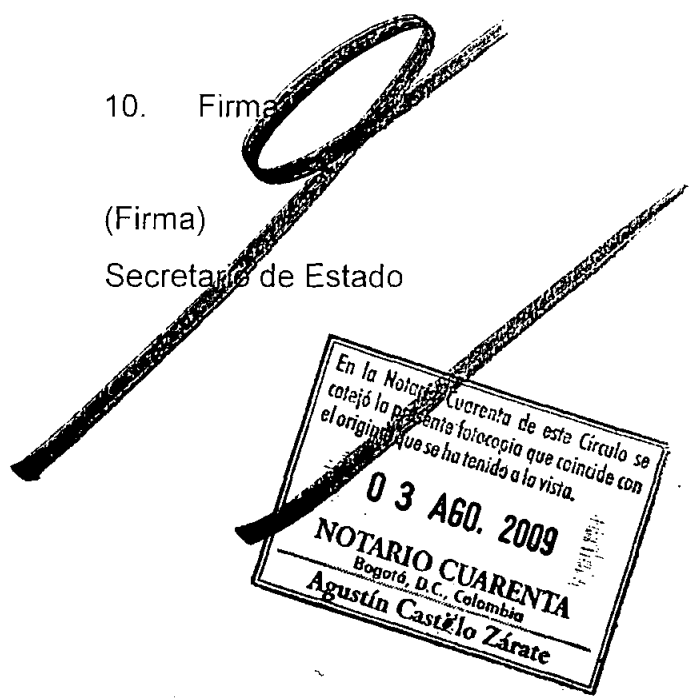
CERTIFICADO

- 5. en Sacramento, California
- 6. el 15 de diciembre de 2005
- 7. por el Secretario de Estado Delegado, Estado de California
- 8. No. 267083
- 9. Sello/Timbre

10. Firma

(Firma)

Secretario de Estado



RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

Estado de California)
 } ss.
 Condado de San Mateo)

El 6 de diciembre de 2005, ante mi, AIDA MICLAT GUIAM, apareció personalmente
 Thimoty R. Schwartz

- ☐ a quien conozco personalmente
- ☒ quien demostró ante mi en base a evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre esta suscrito en el instrumento y quien reconoció ante mi que ejecutó el mismo en su capacidad autorizada, y que por su firma en el instrumento la persona o la entidad a nombre de la cual la persona actuó, ejecutó el instrumento.

Hay un sello que dice:
 AIDA MICLAT GUIAM
 COMISIÓN # 14556612
 Notario Público-California
 Condado de San Mateo
 Mi comisión expira Dic. 9 de 2007

Atestigua mi firma y sello oficial,

AIDA MICLAT GUIAM

-----OPCIONAL-----

Aunque la información en esta sección no es requerida por la ley, puede probar ser valiosa para las personas que se basan en el documento y puede prevenir la remoción y readhesión fraudulenta de esta forma a otro documento

Descripción adicional de cualquier documento anexo

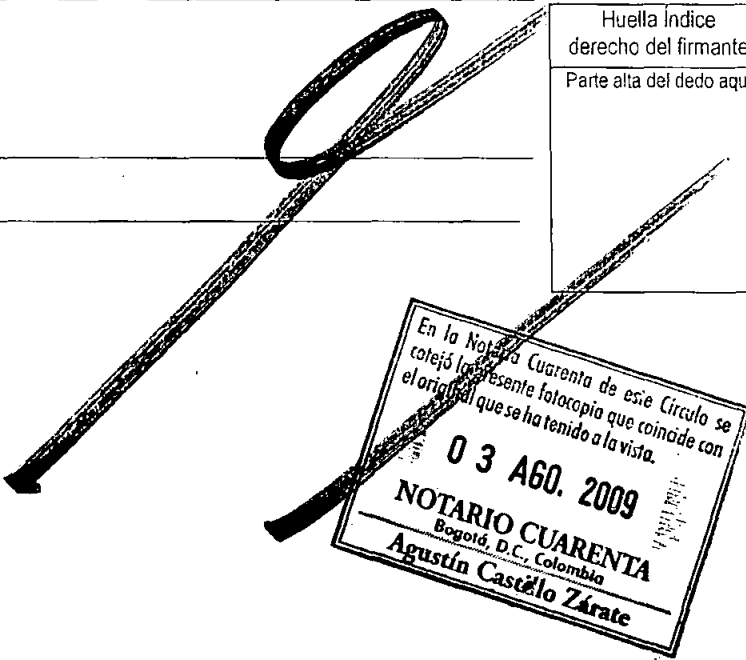
Título o tipo de documento: _____
 Fecha del Documento: _____ Número de páginas: _____
 Firmante(s) diferente(s) a (los) nombrado(s) arriba: _____

Capacidad(es) Reivindicada(s) por el (los) firmante(s)

- Nombre del firmante: _____
- ☐ Individuo
 - ☐ Funcionario Corporativo – Título(s): _____
 - ☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
 - ☐ Abogado de hecho
 - ☐ Fideicomisario
 - ☐ Guardián o conservador
 - ☐ Otro: _____

El firmante representa: _____

Huella Índice derecho del firmante
Parte alta del dedo aquí



AUTORIZACION

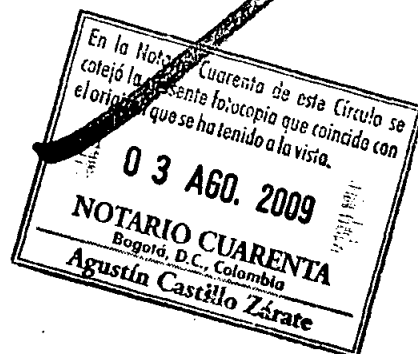
Genentech, Inc. por la presente autoriza a cualquiera de Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec y Thomity R. Schwartz, mientras permanezcan como empleados de Genentech, Inc., a ejecutar, a su nombre, cualquier solicitud asociada con presentación, procesamiento, consecución, y extensión y mantenimiento de concesión de solicitudes de patente y marca registrada en los Estados Unidos y países extranjeros, contratos relacionados con depósitos biológicos con la Colección Americana de Tipo de Cultivo, y cesiones a publicistas de derechos de autor que cubran los trabajos de autoría de los empleados de Genentech.

27 de Agosto de 2002

Fechado

(Firma)

Sean A. Johnston

Vicepresidente, Propiedad Intelectual
Genentech, Inc.

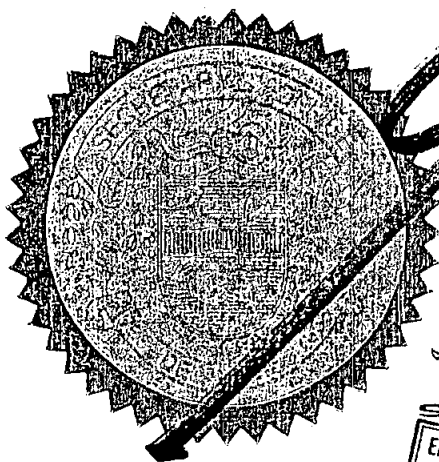
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

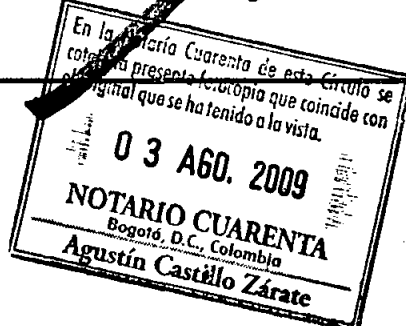
1. Country: United States of America
2. This public document:
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254030
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



Harriet Smith Windsor
Secretary of State



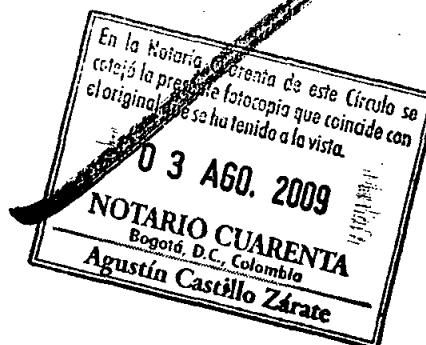
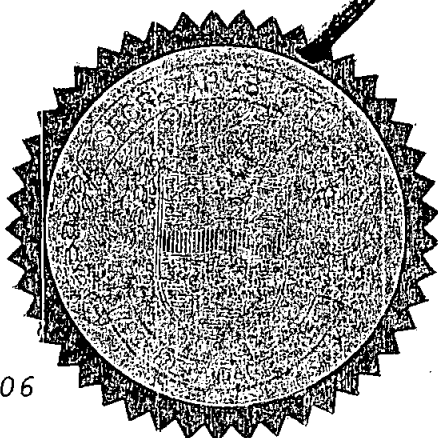
226

Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor
Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900384

DATE: 05-24-05

AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "Corporation"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

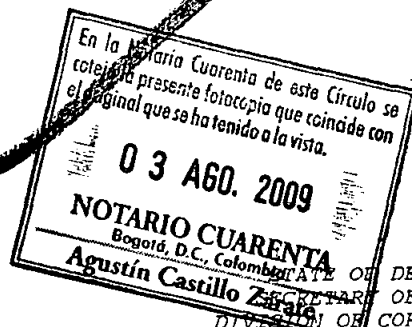
The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("Delaware Law").



ARTICLE 4

SECTION 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

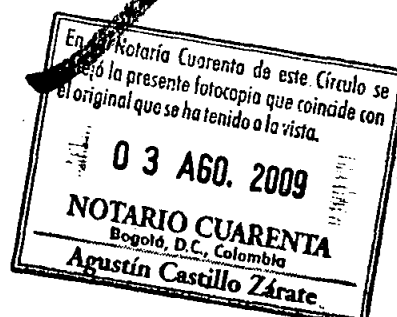
(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

SECTION 4.02. *Common Stock.* (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

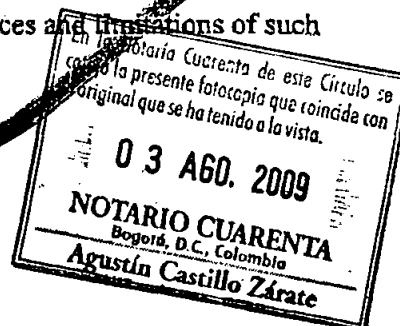
SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of



the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

- (i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;
- (ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;
- (iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;
- (iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;
- (v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;
- (vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;
- (vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and
- (viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.



230

ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

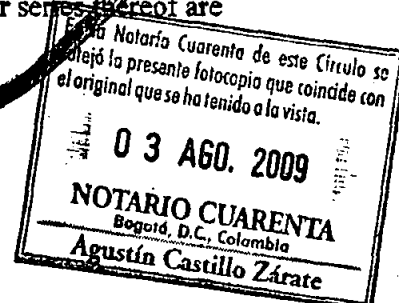
(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are



divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

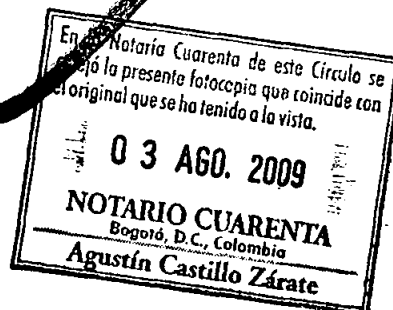
SECTION 6.02. *Ballots.* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors.* (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee, or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or



232

not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

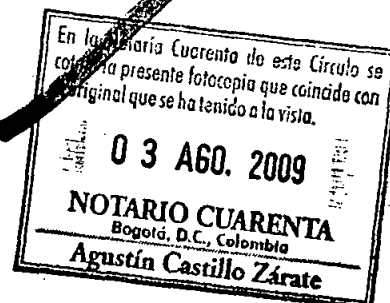
(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, rescission, adoption or modification.

ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities



233

of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

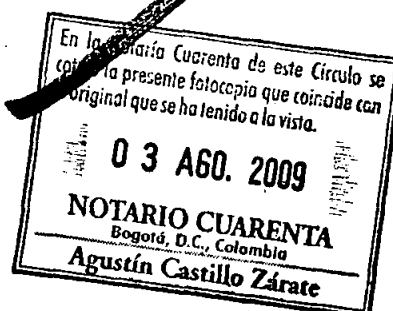
SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities.* In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.



SECTION 8.04. *Deemed Consent of Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

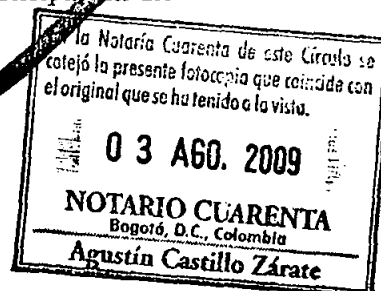
SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "Corporation" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests, and (ii) the term "Roche" shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are "affiliates" (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

SECTION 8.06. *Termination: Binding Effect.* Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. *Article 9.* The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

ARTICLE 9

SECTION 9.01. *Contracts Not Void.* No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the



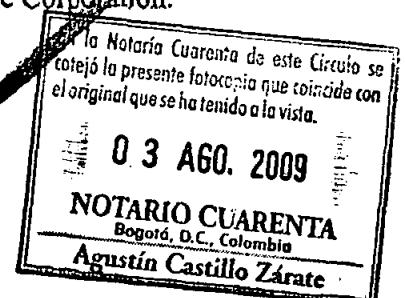
meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "Corporation" and "Roche" have the meanings set forth in Section 8.05.

SECTION 9.02. *Quorum.* Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. *No Liability For Good Faith Actions.* Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer or director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

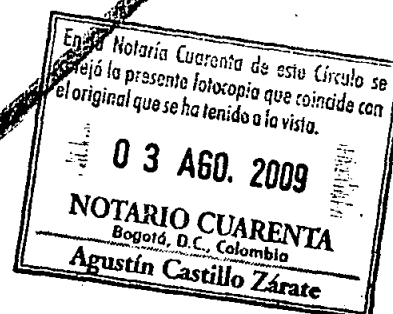
SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

SECTION 9.05. *Contracts Covered.* For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.



SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

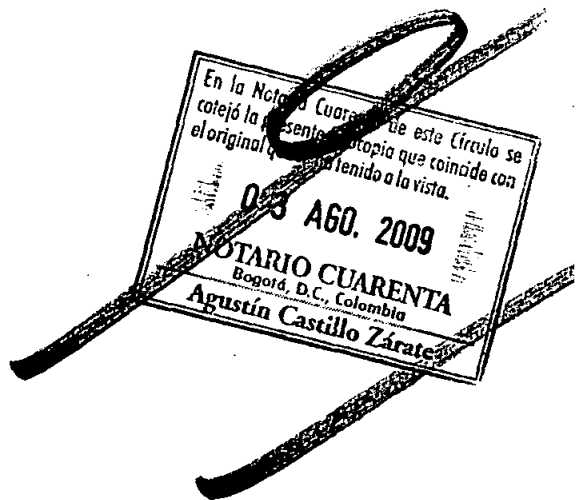
SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.



IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary



238

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

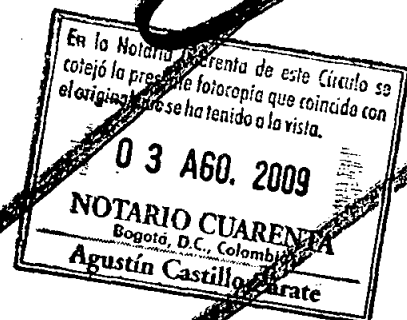
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254030
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



239

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL VIGÉSIMO SEGUNDO DÍA DE JULIO, A. D. 1999, A LAS 9 EN PUNTO DE LA MAÑANA.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900384

FECHA: 05 - 24 - 05

240

CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
GENENTECH, INC.

Genentech, Inc (la "**Corporación**"), una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, por la presente corrige el Certificado de Incorporación, el fue presentado originalmente el 23 de diciembre de 1986, bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y corregido subsiguientemente.

Por la presente se vuelve a redactar el certificado de incorporación de la Corporación y se corrige aun más para que diga en su totalidad lo que sigue:

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

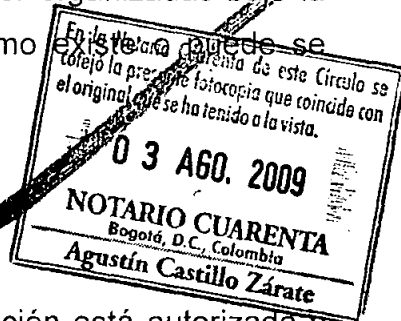
La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTICULO 3

El propósito de la Corporación es el de participar en cualquier acto o actividad legal para las cuales las corporaciones pueden ser organizadas bajo la Ley General de Corporación del Estado de Delaware como existe en la actualidad modificada la misma en adelante ("**Delaware Law**").

ARTICULO 4

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de cuatrocientos millones (400,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones



211

preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Trecientos millones (300,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

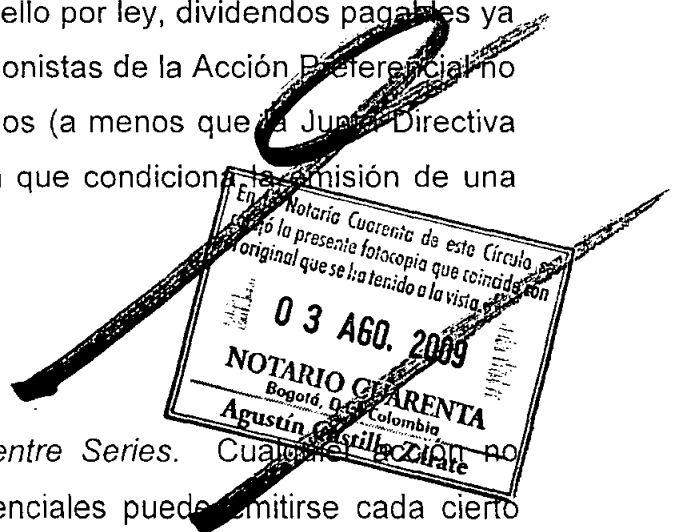
(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de la Corporación con derecho a votar por la misma independiente de las consideraciones de la Sección 242(b)(2) de la Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción Común.* (a) *Emisión y Consideración.* Cualquier acción sin emitir o del tesoro del las Acciones Comunes puede emitirse para tal consideración como pueda fijarse de acuerdo con la ley aplicable cada cierto tiempo por la Junta Directiva.

(b) *Dividendos.* Sujeto a los derechos de los accionistas de las Acciones Preferenciales, los accionistas de Acciones Comunes deberán tener el derecho a recibir, cuando y como se declare por la Junta Directiva, de los activos de la Corporación los cuales están disponibles para ello por ley, dividendos pagables ya sea en dinero, propiedad, o acciones y los accionistas de la Acción Preferencial no tendrán derecho a participar en tales dividendos (a menos que la Junta Directiva determine lo contrario en cualquier resolución que condicione la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCIÓN 4.03. *Acción Preferencial*

(a) *Series y Límites de Variaciones entre Series.* Cualquier acción sin emitir o del tesoro de las Acciones Preferenciales puede emitirse cada cierto tiempo en una o más series para tal consideración como pueda ser fijada cada cierto tiempo por la Junta Directiva. Antes de que se emita cualquier acción de las Acciones Preferenciales de cualquier serie particular, se deberá presentar un certificado ante el Secretario de Estado de Delaware estableciendo las designaciones, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones que irán anexas a las Acciones Preferenciales de tal serie y tales otras cuestiones como puedan requerirse, y la Junta Directiva deberá fijar y determinar, y por la presente está expresamente autorizada para fijar y determinar, en la forma provista por la ley, los



particulares de las acciones de tal serie (siempre y cuando no sean inconsistentes con las condiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluyendo, pero sin limitarse a, las siguientes:

(i) la designación distintiva de tal serie y el número de las acciones que han de constituir tal serie, numero que puede incrementarse (excepto cuando lo determine de otro modo la Junta Directiva al crear tal serie) o reducida (pero no por debajo del número de acciones de las mismas que están vigentes) cada cierto tiempo por una acción semejante de la Junta Directiva;

(ii) la tasa anual de dividendos a pagar sobre las acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales se pagarán tales dividendos y le fecha a partir de la cual los dividendos serán acumulativos en el evento que la Junta Directiva determine que los dividendos serán acumulativos;

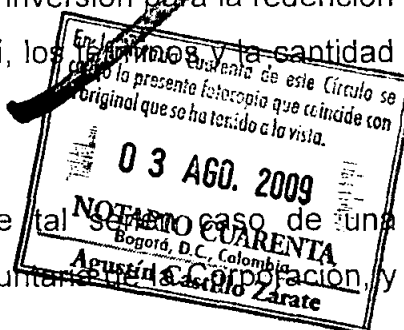
(iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;

(iv) si tal serie tendrá o no privilegios de conversión y, de ser así, los términos y condiciones de tal conversión, incluyendo, pero sin estar limitado a, la condición para ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y de tal forma como la Junta Directiva lo determine;

(v) si las acciones de tal serie serán o no redimibles y, de ser así, los términos y condiciones de tal redención, incluyendo la fecha o fechas en las cuales o después de las cuales pueden ser redimibles, y la cantidad a pagar por acción en caso de redención, cantidad que variará bajo diferentes condiciones y en diferentes fechas de redención;

(vi) si tal serie tendrá o no un fondo de inversión para la redención o compra de acciones de esa serie y, de ser así, los términos y la cantidad de tal fondo de inversión;

(vii) los derechos de las acciones de tal serie en caso de una liquidación, disolución o cierre voluntaria o involuntaria de la Corporación;



los derechos relativos de prioridad, de haber, de pago de acciones de esa serie; y

(viii) cualquier otro derecho relativo, preferencia y limitación de tal serie.

ARTICULO 5

SECCION 5.01. *Enmiendas a los estatutos por los Directores.* (a) En adición y no limitando los poderes conferidos por estatutos, la Junta Directiva esta expresamente autorizada para hacer, alterar, enmendar, rechazar y rescindir los estatutos de la Corporación, sujetos a las secciones 5.01(b) y 5.01(c) a continuación.

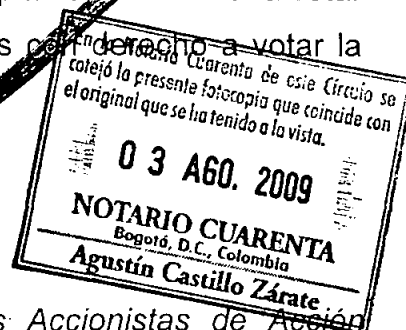
(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 5.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos solo pueden ser alteradas, enmendadas, repelidas, o rescindidas por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar las mismas.

SECCION 5.02. *Enmienda del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación solo puede ser alterada, enmendada, repelida, o rescindida por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a voto sobre la misma que representen a más del 60% de las acciones con derecho a votar la misma. La sección 5.01(c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar la misma que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar la misma.

ARTICULO 6

SECCION 6.01. *Elección del Directorio por los Accionistas de Acción Preferencial.* Durante cualquier periodo cuando los accionistas de cualquier

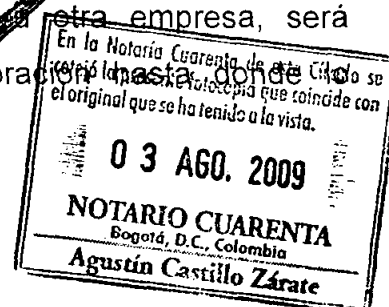


acción preferencial cualquiera de una o más series de las mismas, que voten como una clase, tengan derecho a elegir un número específico de directores, por razón a atrasos en los dividendos u otras condiciones que les dan el derecho a hacerlo, entonces y durante el tiempo que continúe el derecho (i) el número de directores autorizado de otro modo será incrementado por tal número de directores especificado, y los accionistas de tales Acciones Preferenciales o tales series de las mismas, que votan como una clase, tendrán derecho a elegir los directores adicionales para lo que se provee, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones Preferenciales o series; (ii) cada uno de tales directores adicionales servirá durante tal termino, y tendrá tales poderes de voto, como se han de otorgar en las provisiones pertinentes a tales Acciones Preferenciales o series; y (iii) siempre que los accionistas de cualquiera de tales Acciones Preferenciales o series de las mismas están desprovistos de tales derechos a elegir un número específico de directores, votando como clase, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones preferenciales o series, los términos de oficio de todos los directores elegidos por los accionistas de tales Acciones preferenciales o series, que votan como clase, de acuerdo con las condiciones o elegidos para llenar cualquier vacante resultante de la muerte, renuncia o remoción de directores así elegidos por los accionistas de tales Acciones Preferenciales o series, terminarán en adelante y el número autorizado de directores será reducido en concordancia.

SECCION 6.02. *Votaciones.* Las elecciones de directores en una reunión anual o especial de accionistas necesaria no serán por votos escritos a menos que los estatutos de la Corporación digan lo contrario.

SECCION 6.03. *Eliminación de cierta responsabilidad personal de los directores.* (a) Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por daños monetarios por violación del deber fiduciario como director hasta donde lo permita la Ley de Delaware.

(b) Cada persona (y sus herederos, ejecutores o administradores de tal persona) quien fue o es una parte o esta amenazado de ser parte de, o esta involucrado en cualquier acción, demanda o proceso amenazado, pendiente, o completado, ya sea civil, criminal, administrativo o investigativo, por razón del hecho de que esa persona es o fue un director de la Corporación o es o estaba sirviendo por solicitud de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso o otra empresa, será indemnizado y completamente protegido por la Corporación hasta donde la Ley de Delaware permita.



permita la Ley de Delaware. El derecho a la indemnización concedido en esta sección 6.03 también debe incluir el derecho a que la Corporación le pague los gastos incurridos en conexión cuna cualquiera de tales procesos por adelantado de su decisión final hasta donde los autoriza la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferido en esta sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, por acción de su Junta Directiva, proporcionar indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta tal punto y a tal efecto como lo determine apropiado la Junta Directiva y lo autorice la Ley de Delaware.

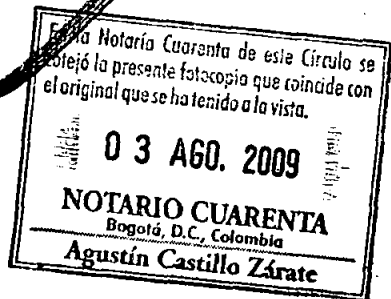
(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa contra cualquier gasto, responsabilidad o pérdida incurrida por tal persona en cualquier capacidad o que surge de su estado como tal, ya sea si la Corporación tiene o no el poder de indemnizarlo contra tal responsabilidad bajo la ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán exclusivos de ningún otro derecho el cual cualquier otra persona pueda tener o adquirir de aquí en adelante.

(f) Ni la alteración, enmienda, rechazo o rescisión de esta Sección 6.03, ni la adopción de ninguna condición de este Certificado de Incorporación o de los Estatutos de la Corporación, ni, hasta donde lo permite la Ley de Delaware, ninguna modificación de la ley, debe eliminar o reducir el efecto de esta Sección 6.03 respecto a ninguno de los actos u omisiones que ocurran antes de tal alteración, enmienda, rechazo, rescisión, adopción o modificación.

ARTICULO 7

SECCION 7.01, *Sección 203 de la Ley de Delaware*. Por la presente la Corporación elige no ser gobernada por la Sección 203 de la Ley de Delaware.



ARTICULO 8

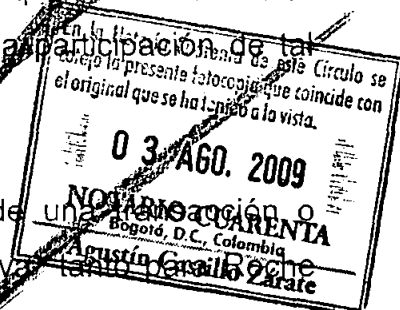
SECCION 8.01. *Relación con Roche.* Anticipándose a que la Corporación cese de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define en la Sección 8.05) y Roche puede entrar en actividades o líneas de negocios semejantes o similares y tener un interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus relaciones contractuales, corporativas y de negocios con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades concomitantes a cualquier director, quien desea y se propone satisfacer completamente tales deberes fiduciarios del director, al determinar el alcance completo de tales deberes en cualquier situación particular, las condiciones de este artículos 8 se establecen para regular, definir y guiar la conducta de ciertas cuestiones de la Corporación ya que pueden involucrar a Roche y sus funcionarios y directores, y los poderes, derechos, deberes y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con éste.

SECCION 8.02. *Actividades en Negocios Similares.* Excepto que Roche Holdings, Inc. pueda de otra forma acordarlo por escrito,

(a) Roche no tendrá el deber de abstenerse de entrar directamente o indirectamente en actividades de negocios o líneas de negocios semejantes o similares a las de la Corporación, y

(b) ni Roche ni ninguno de sus funcionarios o directores de la misma será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar cualquier deber fiduciario por razón de alguna de tales actividades de Roche de la participación de tal persona en las mismas.

En el evento que Roche adquiriera conocimientos de una oportunidad corporativa como para la Corporación, Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario como accionista de la Corporación o la persona que controla a un accionista por razón del hecho



247

que Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma, dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad, o no comunica información respecto, u ofrece, tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.03. *Oportunidades Corporativas.* En el evento que un director, funcionario o empleado de la Corporación quien también es director, funcionario o empleado de Roche adquiera conocimiento de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (ya se si esta transacción o materia potencial es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación o no), tal director, funcionario o empleado debe tener el derecho a ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o Roche como tal director, funcionario o empleado los considere apropiado bajo las circunstancias de su discreción, y tal director, funcionario o empleado no será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario o deber de lealtad o faltar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de ningún beneficio personal inapropiado por razón del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de a la Corporación) o no comunicó información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche busca o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 8.

SECCION 8.05, *Definiciones.* Para propósitos de este Artículo 8 y el Artículo 9 solamente, (i) el término **"Corporación"** debe significar la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido y otras entidades en las cuales la Corporación posee un beneficio (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poder de voto o intereses de voto similares, y (ii) el término **"Roche"** debe significar Roche Holdings, Inc y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido, asociaciones y otras entidades (diferentes a la Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son **"afiliados"** (como se

la Notaría Cuarenta de este Circulo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

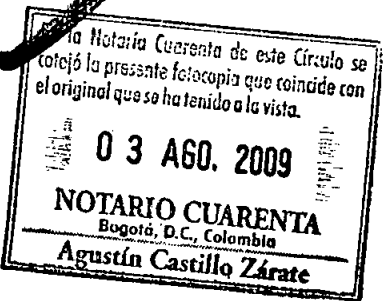
define en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó) de Roche Holdings, Inc.

SECCION 8.06, *Finalización: Efecto Obligante*. Son consideración con nada en este Certificado de Incorporación que lo contradiga, las condiciones anteriores de este Artículo 8 deberán expirar en la fecha que Roche cese de poseer con beneficios Acciones Comunes que representen al menos 5% del número de acciones vigentes de las Acciones Comunes de la Corporación y nadie que se director o funcionario de la Corporación sea también director o funcionario de Roche. Ni tal vencimiento, ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 8 así como tampoco ninguna condición de este Certificado de Incorporación Enmendado y Vuelto a Redactar inconsistente con alguna de las condiciones de este Artículo 8 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 respecto a cualquier materia, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, excepto por este Artículo 8, pueda acaecer o surgir, antes de tal vencimiento, alteración, enmienda o adopción.

SECCION 8.07. *Artículo 9*. Las condiciones de este Artículo son adicionales a las condiciones del Artículo 9.

ARTICULO 9

SECCION 9.01. *Contratos no nulos*. Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización de los mismos) entre la Corporación y Roche será nulo u anulable solamente por razón de que Roche es parte del mismo, o solamente porque cualquiera de los directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados a Roche están presentes en o participan en la reunión de la Junta Directiva o comité de la misma que autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, enmienda, modificación o finalización o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito pero cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo) estará gobernado por las condiciones de este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y otras leyes aplicables. Para propósitos de este Artículo 9, los términos "**Corporación**" y "**Roche**" tienen los significados establecidos en la Sección 8.05.

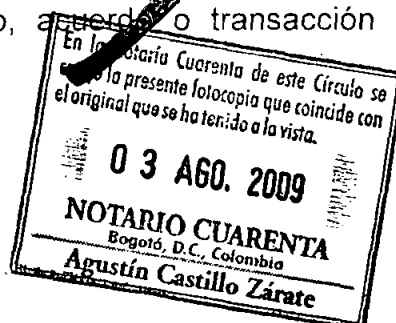


SECCION 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que son también directores o funcionarios de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo). Las acciones vigentes de las Acciones Comunes de propiedad de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de accionistas que autorice o apruebe tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo).

SECCION 9.03. *No responsabilidad por acciones de buena fe.* Ni Roche ni ningún funcionario o director de la misma será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar cualquiera de los deberes fiduciarios o deberes de lealtad o por fallar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o por derivación de cualquier beneficio personal por razón del hecho que Roche o un funcionario o director de la misma de buena fe tome cualquier acción o ejerza cualquier derecho o de o retenga cualquier consentimiento en conexión con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto dado u otra acción tomada por cualquier persona que es un funcionario, director o representante de Roche, donde el voto o acción es tomado por tal persona en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho o un consentimiento de Roche para los propósitos de cualquiera de tal acuerdo o contrato.

SECCION 9.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 9.

SECCION 9.05. *Contratos cubiertos.* Para propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o cualquier corporación, sociedad, sociedad de riesgo conjunto, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) el cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poderes de voto o intereses de voto similares vigentes se considerará un contrato, acuerdo o transacción con la Corporación.



SECCION 9.06. *Efecto obligante.* Ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 9 ni la adopción de alguna condición inconsistente con cualquier condición de este Artículo 9 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 respecto a cualquier materia que ocurra, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, a no ser por este Artículo 9, pueda acaecer o surgir, antes de tal alteración, enmienda, cambio, rechazo o adopción.

SECCION 9.07. *Artículo 8.* Las condiciones de este Artículo 9 son adicionales a las condiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, el cual ha sido adoptado de acuerdo con las secciones 242 y 245 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware y por consentimiento escrito de el único accionista de la Corporación de acuerdo con la sección 228 de Ley General de Corporación del Estado de Delaware, ha sido ejecutado este 22 de Julio de 1999.

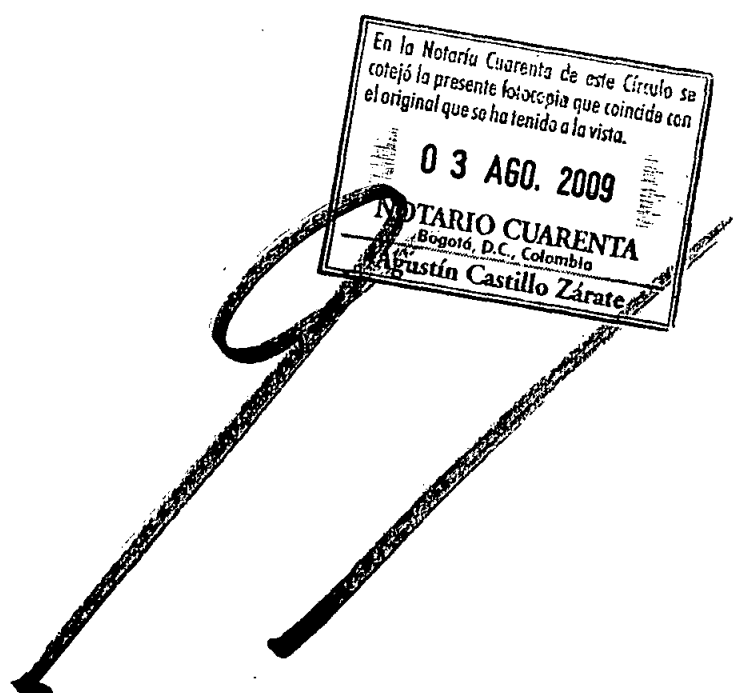
GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente

Consejo General y Secretaría



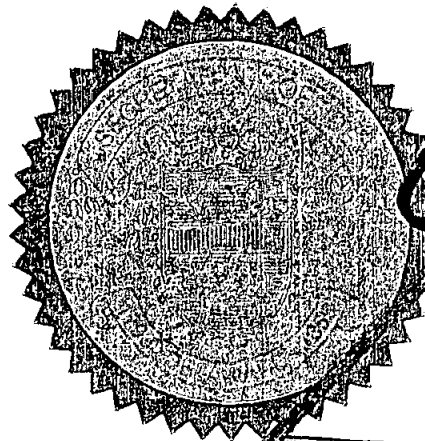
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

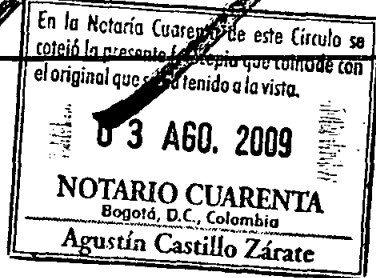
1. Country: United States of America
2. This public document:
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254031
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



Harriet Smith Windsor
Secretary of State

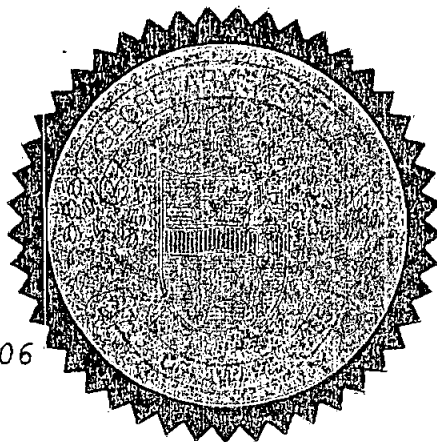


Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900385

DATE: 05-24-05

STATE OF DELAWARE
 SECRETARY OF STATE
 DIVISION OF CORPORATIONS
 FILED 05:00 PM 05/15/2000
 001245251 - 2112549

CERTIFICATE OF AMENDMENT
 OF AMENDED AND RESTATED
 CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

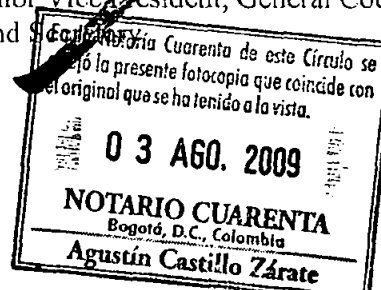
IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By: 

Name: Stephen G. Juelsgaard
 Title: Senior Vice President, General Counsel

and



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254031
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOQUINTO DIA DE MAYO, A. D. 2000, A LAS 5 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900385

FECHA: 05 - 24 - 05

CERTIFICADO DE ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

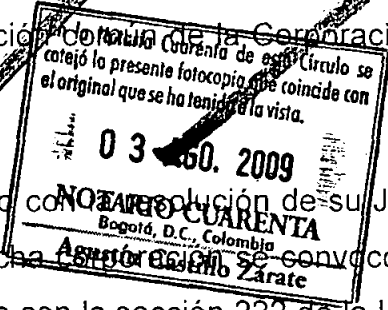
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmiende cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de setecientos millones (700,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Seiscientos millones (600,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha Corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.



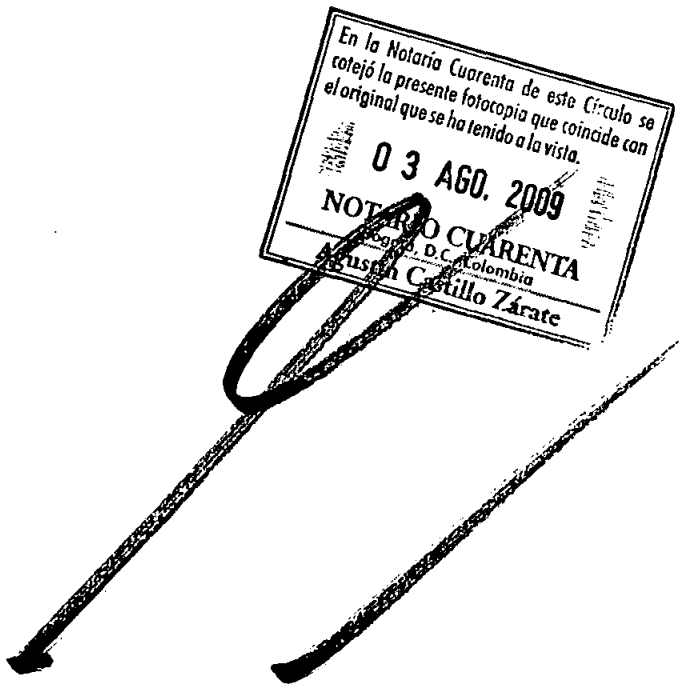
TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

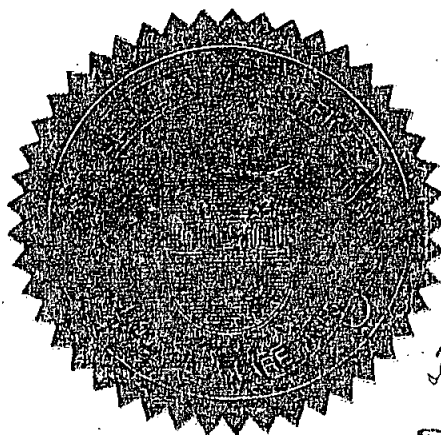
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D: 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

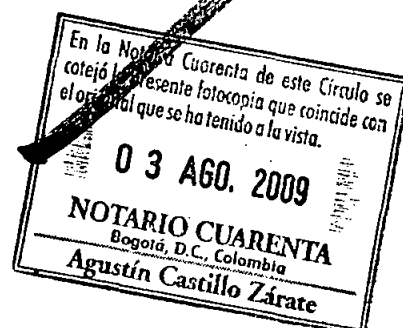
8. No. 0254033

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State



Delaware

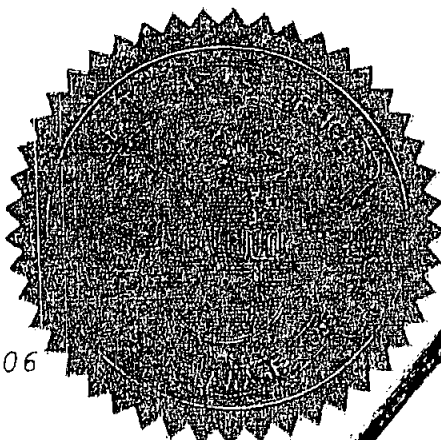
PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.

2112549

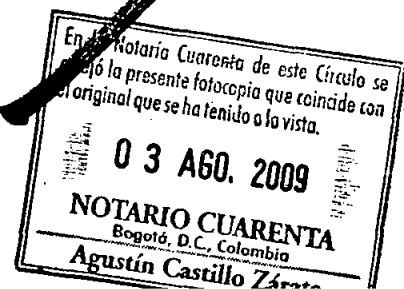
050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900387

DATE: 05-24-05



CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

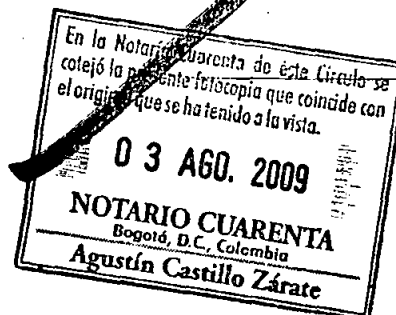
GENENTECH, INC.

By: 

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Executive Vice President, General Counsel
and Secretary

#153087



261

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

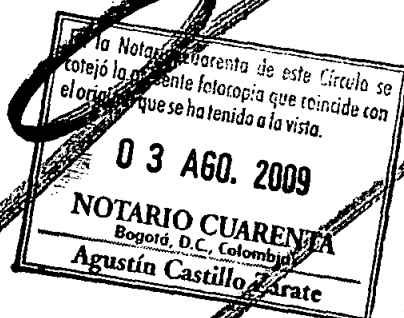
1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254033
9. Sello/timbre
10. Firma

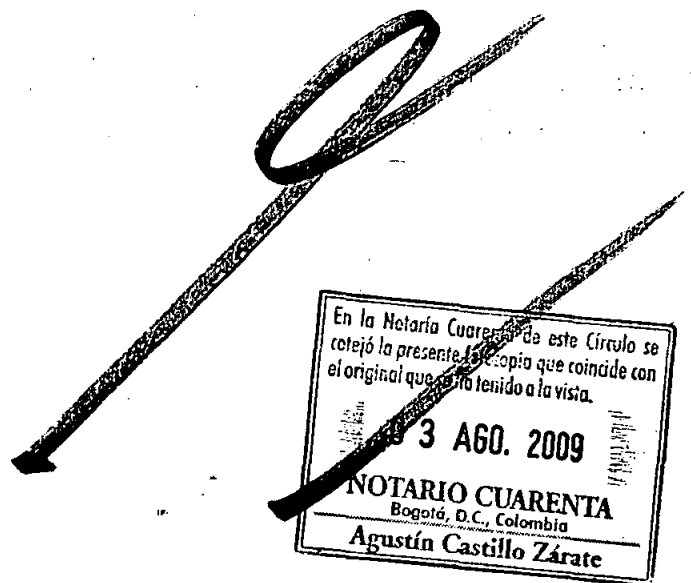
Harriet Smith Windsor (Firma)

Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOSEXTO DIA DE ABRIL, A. D. 2004, A LAS 7:39 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

263

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

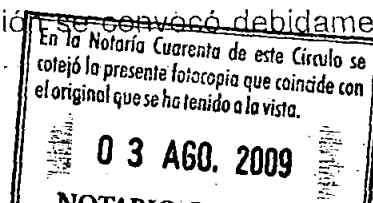
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación está autorizada a emitir es de tres mil cien millones (3,100,000,000) acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3,000,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente.



TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

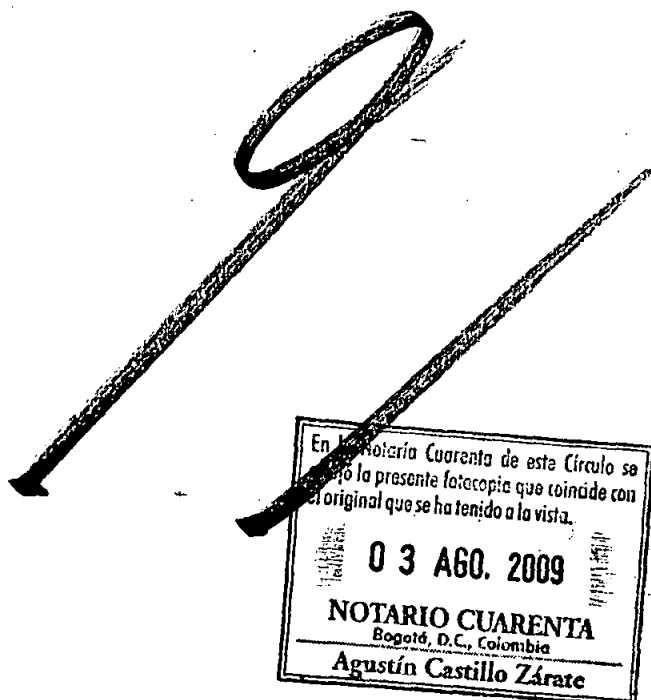
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 16 de Abril de 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

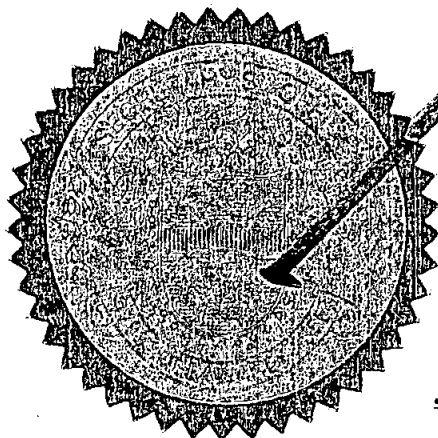
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254032

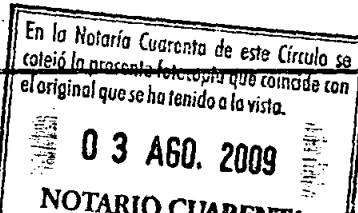
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



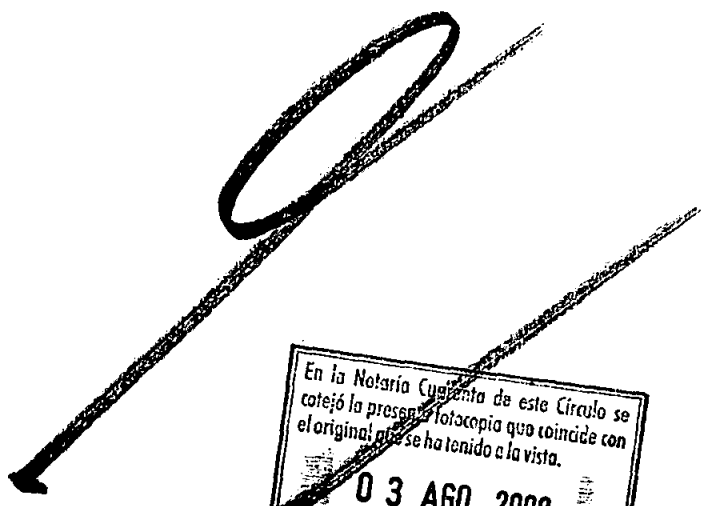
266

Delaware

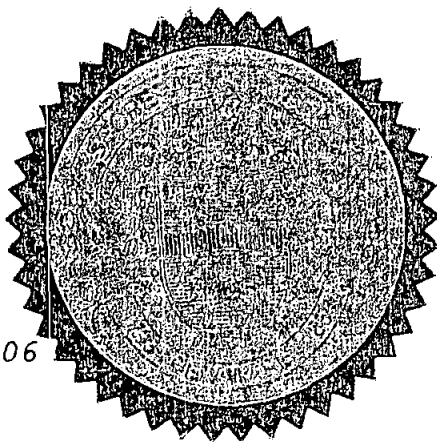
PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.



En la Notaría Cuarenta de este Circuito se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor
Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900386

DATE: 05-24-05

267

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
MAY 05 05:05 PM 05/10/2001
710223224 - 2112549

S ///STATE/OF/DELAWARE///// V
T ///SECRETARY/OF/STATE///// O
A DIVISION/OF/CORPORATIONS// I
M FILED/05/05/PM/05/10/2001/ D
P ///010223224//+//2112549///
BY Sandy Miller

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

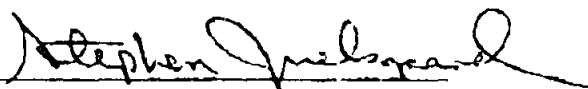
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors at a regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

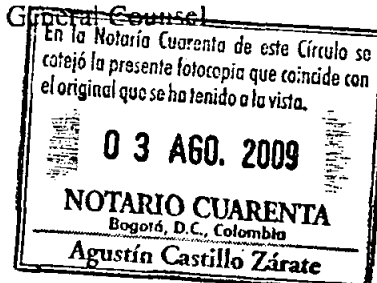
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

By: 
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

86747



APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

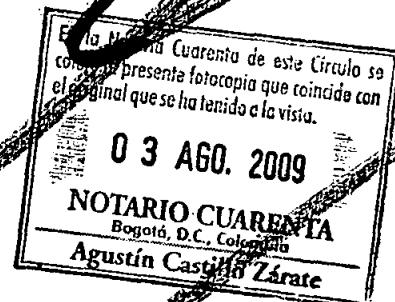
1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254032
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)

Secretaria de Estado



269

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMO DIA DE MAYO, A. D. 2001, A LAS 2:05 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900386

FECHA: 05 - 24 - 05

270

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

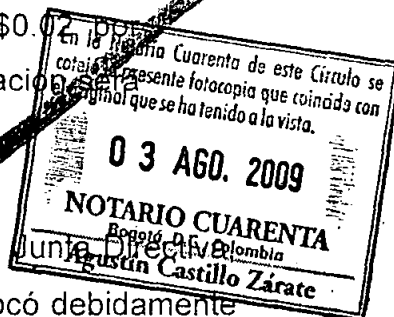
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmiende cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de mil trescientos millones (1,300,000,000) de acciones. En millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Mil doscientos millones (1,200,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.



271

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

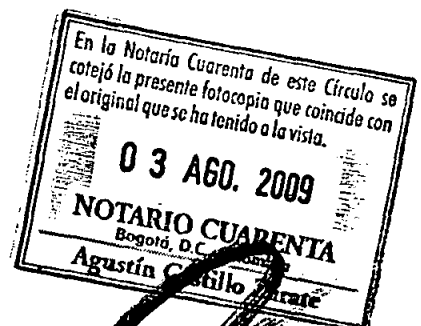
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



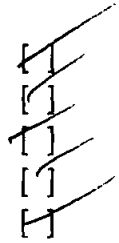
**REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de 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



COMPLETA

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de 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 []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-103883- -00000-0000

Fecha: 2009-09-23 17:21:01 Dep. 2020 NUECREACIONI

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10'

Conmutador: 3 82 0840

Fax: 3505220

E-mail: info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2009

A Doctor(a)
ADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Acreditado(a) y/o Representante de
INVENTECH INC

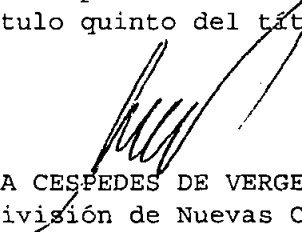
REFERENCIA	Radicación No.	9 103883
	Solicitud internacional	PCT/US2008/002498
	Fecha inicio fase nacional	27/09/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	11087

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

Al cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal b), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


LIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 02 OCT. 2009
ipall