


Industria y
SUPERINT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-115133-00000-0000

Fecha: 2013-05-08 15:15:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 80

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-100099-00007-0000

Fecha: 2013-05-08 15:15:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 80

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION
Divisional Expediente: 11-100.099

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: MOLÉCULAS DE ANTICUERPO QUE TIENEN ESPECIFICIDAD POR HUMANO OX40

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL A61 K 39/395

71. SOLICITANTE: UCB PHARMA S.A

DOMICILIO: Bruselas, Bélgica

74. APODERADO DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C.,



No. 13-115133- -00000-0000

Fecha: 2013-05-08 15:15:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 80



No. 11-100099- -00007-0000

Fecha: 2013-05-08 15:15:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 80

DIRECCIÓN DE NUEVA
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN

1. Identificación del Trámite

☐

Conversión

☒

División

☐

Fusión

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

UCB PHARMA S.A.

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa

Micro ☐

Pequeña ☐

Mediana ☐

Otra ☐

Documento de identificación:

☐

C.C.

☐

C.E.

☐

NIT

☐

Otro

Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Bélgica	60 Allee De La Recherche B-1070	Bruselas
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☐

Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

RODRÍGUEZ D'ALEMAN DILIA MARÍA

Apellidos y Nombre

C.C. 41.654.882

Documento de identificación

20824 CSJ

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 11 No. 86-53, Piso 6, Bogotá D.C., Colombia		Bogotá D.C.
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
notificaciones@clarkemodet.com.co	6350824	6181088

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

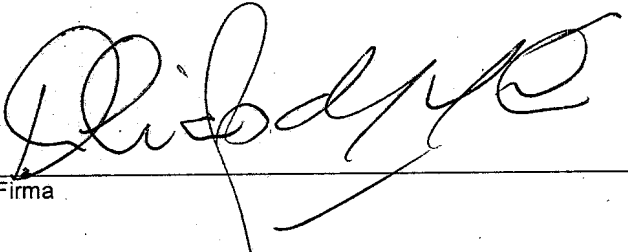
P-3750

000001

4. Datos del trámite		
CONVERSION Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____	DIVISION Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____	FUSION Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____

5. Comprobante de Pago No.	Fecha
----------------------------	-------

6. Anexos
☐ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación ☐ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división ☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

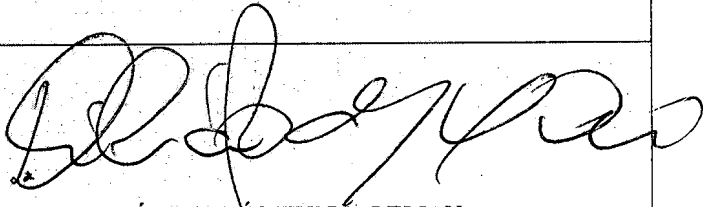
7. Firma	
DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN Nombre y apellidos	 Firma
C.C. 41.654.882	Tarjeta Profesional 20824 CSJ

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
--	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2010/024377	Fecha 17 de Febrero de 2010
Publicación Internacional No.		WO 2010/096418 A2	Fecha 26 de Agosto de 2010
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
MOLECULAS DE ANTICUERPO QUE TIENEN ESPECIFICIDAD POR HUMANO OX40			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) A61 K 39/395		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
UCB PHARMA S.A			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN: 60 Allee De La Recherche B-1070		No. TELÉFONO:	
CIUDAD: Bruselas,		CORREO ELECTRONICO:	
PAÍS DE RESIDENCIA: Bélgica		LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Bélgica	
7	INVENTOR (ES)		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1.LAWSON,		Alastair, David, Griffiths	Inglesa
2.NESBITT,		Andrew, Malcolm	Inglesa
3.POPPLEWELL,		Andrew, George	Inglesa
4.SHAW,		Stephen, Graham	Inglesa
5.SHPEKTOR,		Diana	Inglesa
6.ZHANG,		Yi	Inglesa
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
DIRECCIÓN		CIUDAD	PAÍS RESIDENCIA
1. IPD, UCB Celltech 208 Bath Road Slough,		Berkshire SL1 3WE,	Gran Bretaña
2. IPD, UCB Celltech 208 Bath Road Slough,		Berkshire SL1 3WE,	Gran Bretaña
3. IPD, UCB Celltech 208 Bath Road Slough,		Berkshire SL1 3WE,	Gran Bretaña
4. IPD, UCB Celltech 208 Bath Road Slough,		Berkshire SL1 3WE,	Gran Bretaña
5. IPD, UCB Celltech 208 Bath Road Slough,		Berkshire SL1 3WE,	Gran Bretaña
6. IPD, UCB Celltech 208 Bath Road Slough,		Berkshire SL1 3WE,	Gran Bretaña
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
RODRIGUEZ D'ALEMAN		DILIA MARIA	C.C.41.654.882 T.P.20824 CSJ
DIRECCIÓN Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6		No. TELÉFONO 6181088	
CIUDAD Bogotá, D.C.		CORREO ELECTRÓNICO	
PAÍS Colombia		notificaciones@clarkemodet.com.co	
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
Estados Unidos de América		US	61/153.038
			(32) FECHA AAA/MM/DD
			2009/02/17

000002

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	Nº 13-040121 // 13-042753	Fecha 29/04/2013 07/05/2013
16	FIRMA DEL APODERADO :		
 DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN C.C. 41.654.882 T.P. 20824 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción Nº de folios: 44		9. ☐ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones Nº Reivindicaciones: 22		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras Nº folios: 10		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

MOLÉCULAS DE ANTICUERPO QUE TIENEN ESPECIFICIDAD POR HUMANO OX40

La presente invención se relaciona con moléculas de anticuerpo que tienen especificidad para determinantes antigénicos de OX40 y composiciones que comprende las mismas. La presente invención también se relaciona con los usos terapéuticos de las moléculas de anticuerpo, composiciones y métodos para producir dichas moléculas de anticuerpo.

OX40 (también conocido como CD134, TNFRSF4, ACT35 o TXGP1L) es un miembro de la súper familia de receptor TNF, la cual incluye 1-1BB, CD27, CD30 y CD40. El dominio de unión de ligando extracelular de OX40 está compuesto de 3 dominios completos ricos en cisteína (CRD) y un CRD parcial de cuarto terminal C (Bodmer *y otros*, 2002, Trends Biochem Sci, 27, 19 a 26).

El ligando para OX40 es OX40L y 3 copias de OX40 se unen al ligando trimérico para formar el complejo OX40-OX40L (Compaan y Hymowitz, 2006, Estructura, 14, 1321 a 1330). El OX40 es un receptor unido a la membrana; sin embargo también se ha detectado una isoforma soluble (Taylor y Schwarz, 2001, J. Immunol. Métodos, 255, 67 a 72). El significado funcional de la forma soluble es actualmente conocido. El OX40 no es expresado en células T de descanso, pero es transcendentemente expresado en células T activadas después de la ligación del receptor de célula T (TCR). El ligando para el OX40, OX40L, es un miembro de la familia de TNF y está expresado en células que presentan antígeno activado (APC), incluyendo células B, macrófagos, células endoteliales y células dendríticas (DC).

El OX40 es un receptor de coestimulación importante con participación secuencial de CD28 y OX40 que son necesarios para la proliferación óptima de células T y la supervivencia. La ligadura de OX40 en células T activadas lleva a una mayor producción de citoquinas y la proliferación de células CD4+ y CD8+T (Gramaglia *y otros*, 2000, J. Immunol, 165, 3043 a 3050, Bansal-Pakala *y otros*, 2004, J. Immunol, 172, 4821 a 425) y pueden contribuir tanto a las respuestas Th1 y Th2 en curso (Gramaglia *y otros*, 1998, J. Inmuno., 161, 6510 a 6517, Arestides *y otros*, 2002, Eur. J. Immunol. 32, 2874 a 2880). La coestimulación de OX40 prolonga la supervivencia de las células T después de la fase inicial de efectores de la respuesta inmune y aumenta el número de células T de memoria a través de la inhibición de la muerte de células T efectoras.

Cuando la activación inmunitaria es excesiva o no controlada, la alergia patológica, el asma, la inflamación, enfermedades autoinmunes y otras enfermedades relacionadas pueden ocurrir. Debido a que el OX40 funciona para mejorar la respuesta inmune, éste puede exacerbar enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

El papel de las interacciones de OX40/OX40L en modelos de enfermedades ha sido demostrado en ratones de eliminación OX40. En la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), un modelo de esclerosis múltiple, los signos clínicos menos severos de la enfermedad y la reducción de infiltrado inflamatorio en CNS se observó en los ratones de eliminación OX40 (Carboni *y otros*, 2003, J. Neuroinmunología, 145, 1 a 11). También, los ratones de eliminación OX40 preparados y desafiados con ovoalbúmina presentan inflamación pulmonar disminuida (80 a 90% de reducción en la eosinofilia).

000003

reducción de la producción de moco, e hiperactividad de las vías respiratorias significativamente atenuada (Jember *y otros*, 2001, *J. Exp. Med.*, 193, 387 a 392). Los anticuerpos monoclonales para el ligando OX40 murino han demostrado efectos beneficiosos en el modelo de artritis inducida por colágeno de artritis reumatoide (Yoshioka *y otros*, 2000, *Eur. J. Immunol.*, 30, 2815 a 2823), EAE (Nohara *y otros*, 2001, *J. Immunol.*, 166, 2108 a 2115), ratones obesos no diabéticos (NOD) (Pakala *y otros*, 2004, *Eur. J. Immunol.*, 34, 3039 a 3046), colitis en ratones de células T restauradas (Malmstrom *y otros*, 2001, *J. Immunol.*, 166, 6972 a 6981, Totsuka *y otros*, 2003, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 284, G595 a G603) y modelos de inflamación de los pulmones (Salek-Ardakani *y otros*, 2003, *J. Exp. Med.*, 198, 315 a 324, Hoshino *y otros*, 2003, *Eur. J. Immunol.*, 33, 861 a 869). Un anticuerpo al OX40L humano ha sido perfilado en un modelo de inflamación en el pulmón en monos rhesus y dio lugar a niveles reducidos de IL-5, IL-13 y células T de memoria efectoras en el fluido de lavado bronquial después de la exposición al alérgeno (Seshasayee *y otros*, 2007, *J. Clin. Invest.*, 117, 3868 a 3878).

Un aumento en la expresión de OX40 se ha notado en varias enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Esto incluye un aumento en la expresión de OX40 en células T aisladas del fluido sinovial o pacientes con artritis reumatoide (Brugnoni D *y otros*, 1998, *Br. J. Rheum.*, 37, 584 a 585; Yoshioka *y otros*, 2000, *Eur. J. Immunol.*, 30, 2815 a 2823; Giacomelli R *y otros*, 2001, *Clin. Exp. Rheumatol.*, 19, 317 a 320). De forma similar, un aumento en la expresión de OX40 se ha notado en el tejido gastrointestinal de pacientes con colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn (Souza *y otros*, 1999, *Gut*, 45, 856 a 863; Stuber *y otros*, 2000, *Eur. J. Clin. Invest.*, 30, 594 a 599) y en lesiones activas de pacientes con esclerosis múltiple (Carboni *y otros*, 2003, *J. Neuroimmunology*, 145, 1 a 11). El OX40L también puede ser detectado en músculo suave de las vías aéreas en humanos (ASM) y las células ASM de pacientes con asma muestran respuestas inflamatorias mayores a la ligación de OX40L que en donantes saludables, lo que indica un papel para el trayecto de OX40/OX40L en asma (Burgess *y otros*, 2004, *J. Allergy Clin Immunol.*, 113, 683 a 689; Burgess *y otros*, 2005, *J. Allergy Clin Immunol.*, 115, 302 a 308). También se ha reportado que las células CD4⁺ T aisladas de sangre periférica de pacientes con lupus sistémico eritematosus (SLE) expresaron niveles elevados de OX40 lo cual está asociado con la actividad de la enfermedad (Patschan *y otros*, 2006, *Clin. Exp. Immunol.*, 145, 235 a 242).

Debido al papel del OX40 en la alergia, asma y enfermedades asociadas con autoinmunidad e inflamación, un acercamiento a la terapia en estas enfermedades es bloquear el señalamiento de OX40-OX40L a través del uso de anticuerpos anti-OX40L o antagonistas de anticuerpos anti-OX40L.

Los anticuerpos anti-OX40L han sido descritos, ver por ejemplo WO2006/029879. Varios anticuerpos anti-OX40 agonísticos han sido descritos pero muy pocos anticuerpos anti-OX40 antagonistas son conocidos. Un anticuerpo OX-40 anti-ratón de conejo policlonal fue producido por Stuber *y otros*, 1996, *J. Exp. Med.*, 183, 979 a 989, el cual bloquea la interacción entre OX40 y OX40L. Los anticuerpos monoclonales de ratón, 131 y 315 los cuales se unen a OX40 humano fueron generados por Imura *y otros*, 1996, *J. Exp. Med.*, 2185 a 2195.

000004

Los anticuerpos antagonistas completamente humanos han sido descritos en WO2007/062245, la afinidad más alta de estos anticuerpos tuvieron una afinidad por OX40 expresado de superficie de la célula (células T activadas) de 11nM.

Los anticuerpos antagonistas humanizados han sido descritos en WO2008/106116 y el anticuerpo con la mejor afinidad por OX40 tuvo una afinidad de 0.94nM.

Otros anticuerpos anti-OX40 han sido descritos, incluyendo L106 murina (Patente de los EE.UU. 6.277.962) y ACT35 murina, disponibles comercialmente de eBioscience.

De acuerdo con lo anterior, todavía existe una necesidad en el estado de la técnica por un anticuerpo anti-OX40 mejorado adecuado para tratar pacientes.

Ahora se ha identificado un anticuerpo anti-OX40 antagonista de alta afinidad adecuado para su uso en el tratamiento o profilaxis de desórdenes patológicos mediados por OX40 o asociados con un nivel aumentado de OX40.

Breve Descripción de las Figuras

- Figura 1 muestra ciertas secuencias de aminoácido o ADN relacionadas con un anticuerpo de acuerdo con la divulgación.
- Figura 2 muestra una representación diagramática de un anticuerpo del formato A26 Fab'-PEG.
- Figura 3 muestra la afinidad basada en la célula del anticuerpo A26 Fab'-PEG para OX40 de superficie de célula
- Figura 4 muestra el porcentaje de inhibición del OX40L que se une a las células T activadas por el anticuerpo A26 Fab'-PEG
- Figura 5 muestra el porcentaje de inhibición de proliferación de célula T por el anticuerpo A26 Fab'-PEG en el MLR humano.
- Figura 6 muestra la inhibición de A26 Fab'-PEG de poliferación de PBMC expuesto a Tetanus Toxoide.
- Figura 7 muestra un porcentaje de inhibición de A26 Fab'-PEG de la producción de IL-13 de PBMC expuesto a extracto alérgico *Dermatophagoides pteronyssinus*
- Figura 8 muestra un porcentaje de inhibición de A26 Fab'-PEG de la producción de citoquina de PBMC expuesto a extracto alérgico *Dermatophagoides pteronyssinus*
- Figura 9 muestra la proliferación de células CD4+ y CD8+ T que inhiben A26 Fab'-PEG en un modelo Hu-SCID
- Figura 10 muestra la inhibición de resultado de artritis (como área bajo la curva) por A26 Fab'-PEG en un modelo *in vivo*.
- Figura 11 muestra los resultados histológicos totales en un modelo *in vivo* para artritis.

El anticuerpo de rata original a partir del cual se derivan los anticuerpos humanizados es referido acá como CA044_00026.

El CA044_00026 humanizado generalmente en la forma de un fragmento Fab u otros fragmentos, es referido como A26.

El anticuerpo PEGilatado "A26" en el formato mostrado en la Figura 2, es referido acá como A26Fab'-PEG.

000005

Los residuos en los dominios variables de anticuerpo son convencionalmente enumerados de acuerdo con un sistema diseñado por Kabat y *otros*. Este sistema se define en Kabat y *otros*, 1987, en *Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico*, Departamento de los EE.UU. de Salud y Servicios Humanos, NIH, EE.UU. (en adelante “Kabat y *otros (supra)*”). Este sistema de numeración se utiliza en la presente descripción, excepto cuando se indique lo contrario.

Las designaciones del residuo Kabat no siempre corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácidos. La secuencia de aminoácido lineal real puede contener menos o aminoácidos adicionales que en la numeración de Kabat estricta que corresponde a un encogimiento de, o inserción en, un componente estructural, bien sea en la estructura o la región complementariamente determinante (CDR), de la estructura de dominio variable básica. La correcta numeración de Kabat de los residuos puede ser determinada para un anticuerpo dado por medio de la alineación de los residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat “estándar”.

Los CDR del dominio variable de cadena pesada se encuentran en los residuos 31 a 35 (CDR-H1), los residuos 50 a 65 (CDR-H2) y residuos 95 a 102 (CDR-H3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, de acuerdo con Chothia (Chothia, C. y Lesk, *AMJ Mol. Biol.*, 196, 901 a 917 (1987)), el ciclo equivalente de CDR-H1 se extiende desde el residuo 26 al residuo 32. Así, a menos que se indique lo contrario “CDR-H1” como se emplea acá es la intención de referirse a los residuos de 26 a 35, según lo descrito por una combinación del sistema de numeración de Kabat y la definición topológica de bucle de Chothia.

Los CDR del dominio variable de cadena ligera se encuentran ubicados en los residuos 24 a 34 (CDR-L1), residuos 50 a 56 (CDR-L2) y residuos 89 a 97 (CDR-L3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Como se usa acá, el término “anticuerpo antagonista” describe un anticuerpo que es capaz de inhibir y/o neutralizar la actividad de señalización biológica del OX40, por ejemplo por medio del bloqueo de la unión o sustancialmente la reducción de la unión de OX40 al ligando OX40 y así inhibir la activación de OX40.

Los anticuerpos para su uso en la presente invención pueden ser obtenidos usando cualquier método adecuado conocido en el estado del arte. El polipéptido/proteína de OX40 que incluye proteínas de fusión, por ejemplo proteínas de fusiones de OX40-Fc o células (recombinante o naturalmente) que expresan el polipéptido (tal como células T activadas), puede ser utilizado para producir anticuerpos los cuales reconocen específicamente OX40. El polipéptido de OX40 puede ser el polipéptido “maduro” o un fragmento biológicamente activo o un derivado del mismo. Adecuadamente, el polipéptido de OX40 es el polipéptido humano maduro o el dominio extracelular o fragmento del mismo. El dominio extracelular típicamente comprende los aminoácidos 29-214 de la proteína OX40 (SWISS PRT entrada P43489). Los polipéptidos de OX40 pueden ser preparados por medio de procesos bien conocidos en el estado de la técnica a partir de células huésped modificadas genéticamente que comprenden sistemas de expresión o ellas pueden estar recubiertas de fuentes naturales

000006

biológicas. En la presente solicitud, el término “polipéptidos” incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Estos son usados de forma intercambiable a menos que se especifique lo contrario. El polipéptido de OX40 puede en algunos casos ser parte de una proteína más grande tal como una proteína de fusión por ejemplo fusionada con una etiqueta de afinidad. Los anticuerpos generados contra el polipéptido de OX40 pueden ser obtenidos, donde la inmunización de un animal es necesaria, por medio de la administración de polipéptidos a un animal, preferiblemente un animal no humano, usando protocolos bien conocidos y de rutina, ver por ejemplo Libro de Mano de Inmunología Experimental, D. M. Weir (ed.), Vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra 1986. Varios de los animales de sangre tibia, tal como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos o cerdos pueden ser inmunizados. Sin embargo, los ratones, conejos, cerdos y ratas son generalmente más adecuados.

Los anticuerpos para su uso en la presente invención incluyen anticuerpos completos y fragmentos funcionalmente activos o derivados de los mismos y pueden ser, pero no se limitan a, monoclonal, humanizados, completamente humanos o anticuerpos quiméricos.

Los anticuerpos monoclonal pueden ser preparados mediante cualquier método conocido en el estado de la técnica, tal como la técnica de hibridoma (Kohler & Milstein, 1975, *Naturaleza*, 256:495 a 497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor *y otros*, 1983, *Inmunología Hoy*, 4:72) y la técnica de hibridoma EBV (Cole *y otros*, *Anticuerpos Monoclonal y Terapia de Cáncer*, pp 77 a 96, Alan R Liss, Inc., 1985).

Los anticuerpos para su uso en la invención pueden también ser generados usando métodos de anticuerpo de linfocito simple por medio de la clonación y expresión de la región cADN variable de inmunoglobulina generada a partir de linfocitos simples seleccionados para la producción de anticuerpos específicos por medio de, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. *y otros*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93(15):7843 a 78481; WO92/02551; WO2004/051268 y la solicitud de patente internacional No. WO2004/106377.

La detección de anticuerpos puede realizarse mediante ensayos para medir la unión de humanos OX40 y/o ensayos para medir la capacidad de bloquear la unión de OX40 a su ligando, OX40L. Un ejemplo de un ensayo de unión es un método de ELISA, en particular, utilizando una proteína de fusión de los derechos humanos y OX40 Fc humana, que está inmovilizado en placas, y que emplea un anticuerpo conjugado secundario para detectar anticuerpos anti-OX40 unidos a la proteína de fusión. Un ejemplo de un ensayo de bloqueo es un ensayo de citometría de flujo basado en la medición del bloqueo de la proteína de fusión OX40 unión del ligando a OX40 en las células CD4. Un anticuerpo marcado con fluorescencia secundaria se utiliza para detectar la cantidad de proteína de fusión OX40 unión del ligando a la célula. Este ensayo se busca una reducción de la señal de que el anticuerpo en los bloques de sobrenadante de la unión de la proteína de fusión ligando a OX40. Otro ejemplo de un ensayo de bloqueo es una técnica en la que el bloqueo de la coestimulación de células T ingenuas humana mediada por la proteína de fusión ligando OX40 recubiertas de una placa se mide mediante la medición de la incorporación de timidina tritiada.

Los anticuerpos humanizados (los cuales incluyen anticuerpos injertados de CDR) son moléculas de anticuerpos que tienen una o más regiones

000007

determinantes complementarias (CDR) de una especie no humana y una región de estructura de una molécula de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, US 5.585.089; WO91/09967). Se apreciará que sólo puede ser necesario transferir los residuos determinantes de especificidad de los CDR en lugar del CDR en su totalidad (ver por ejemplo, Kashmiri *y otros*, 2005, Métodos, 36, 25 a 34). Los anticuerpos humanizados pueden opcionalmente además comprender uno o más residuos de estructura derivados de especies no humanas de las cuales se derivan los CDR.

Los anticuerpos quiméricos están compuestos de elementos derivados de dos diferentes especies tal como los elementos que retienen las características de las especies de las cuales se derivan. Generalmente, un anticuerpo quimérico comprenderá una región variable de una especie, por ejemplo un ratón, rata, conejo o similares y una región constante de otra especie tal como un humano.

Los anticuerpos para su uso en la presente invención pueden también ser generados usando varios métodos de muestra de fagos conocidos en el estado del arte y que incluyen aquellos divulgados por Brinkman *y otros* (en J. Immunol. Métodos, 1995, 182: 41 a 50), Ames *y otros* (J. Immunol. Métodos, 1995, 184:177 a 186), Kettleborough *y otros* (Eur. J. Immunol. 1994, 24:952 a 958), Persic *y otros* (Gen, 1997 187 9 a 18), Burton *y otros* (Avances en Inmunología, 1994, 57:191 a 280) y WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y US 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Los anticuerpos completamente humanos son aquellos anticuerpos en los cuales las regiones variables y las regiones de contraste (donde estén presentes) de las cadenas pesadas y ligeras son todos de origen humano, o sustancialmente idénticos a secuencias de origen humano, no necesariamente del mismo anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos completamente humanos pueden incluir anticuerpos producidos, por ejemplo mediante los métodos de muestra de fagos descritos anteriormente y anticuerpos producidos por ratones en los cuales los genes de inmunoglobulina murina variable u opcionalmente de región constante han sido reemplazados por sus equivalentes humanos, como se describen en términos generales en EP0546073 B1, US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.661.016, US 5.770.429, EP0438474 and EP0463151.

En una modalidad, la presente invención suministra un anticuerpo agonista que tiene especificada por OX40 humano, que comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende por lo menos un CDR que tiene la secuencia suministrada en la Figura 1 (c) SEQ ID NO:1 para CDR-H1, un CDR que tiene la secuencia de la Figura 1 (c) SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:20 para CDR-H2 y un CDR que tiene la secuencia de la Figura 1 (c) SEQ ID NO:3 para CDR-H3.

En otra modalidad, la presente invención suministra un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, que comprende una cadena pesada, en donde por lo menos dos de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del dominio variable de la cadena pesada se seleccionan de los siguientes: la secuencia dada en SEQ ID NO:1 para CDR-H1, la secuencia dada en SEQ ID NO:2 para CDR-H2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:3 para CDR-H3. Por

000008

ejemplo, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en donde CDR-H1 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:1 y CDR-H2 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:2. Alternativamente, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en donde CDR-H1 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:1 y CDR-H3 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:3, o el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en donde CDR-H2 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:2 y CDR-H3 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:3. Para evitar la duda, se entiende que todas las permutaciones están incluidas.

En otra modalidad, la presente invención suministra un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, que comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:1 para CDR-H1, la secuencia dada en SEQ ID NO:2 para CDR-H2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:3 para CDR-H3.

En otra modalidad, la presente invención suministra un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, que comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:1 para CDR-H1, la secuencia dada en SEQ ID NO:20 para CDR-H2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:3 para CDR-H3.

En una modalidad, la presente invención suministra un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, que comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende por lo menos un CDR que tiene la secuencia dada en la Figura 1 (c) SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:21 para CDR-L1, un CDR que tiene la secuencia de la Figura 1 (c) SEQ ID NO:5 para CDR-L2 y un CDR que tiene la secuencia de la Figura 1 (c) SEQ ID NO:6 para CDR-L3.

En otra modalidad, la presente invención suministra un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, que comprende una cadena ligera, en donde por lo menos dos de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del dominio variable de la cadena ligera se seleccionan de los siguientes: la secuencia dada en SEQ ID NO:4 para CDR-L1, la secuencia dada en SEQ ID NO:5 para CDR-L2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:6 para CDR-L3. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en donde CDR-L1 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:4 y CDR-L2 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:5. Alternativamente, el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en donde CDR-L1 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:4 y CDR-L3 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:6, o el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en donde CDR-L2 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:5 y CDR-L3 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:6. Para evitar la duda, se entiende que todas las permutaciones están incluidas.

En otra modalidad, la presente invención suministra un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, que comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:4 para CDR-L1, la secuencia dada en SEQ ID NO:5 para CDR-L2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:6 para CDR-L3.

En otra modalidad, la presente invención suministra un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, que comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable comprende la secuencia dada en SEQ

ID NO:21 para CDR-L1, la secuencia dada en SEQ ID NO:5 para CDR-L2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:6 para CDR-L3.

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención comprenden adecuadamente una cadena ligera complementaria o una cadena pesada complementaria, respectivamente.

Así en una modalidad, un anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO:1 para CDR-H1, la secuencia dada en la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:20 para CDR-H2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:3 para CDR-H3 y una cadena ligera en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:21 para CDR-L1, la secuencia dada en la SEQ ID NO:5 para CDR-L2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:6 para CDR-L3.

Se apreciará que una o más sustituciones de aminoácidos, adiciones y/o cancelaciones pueden ser hechas a los CDR suministrados por la presente invención sin alterar significativamente la habilidad del anticuerpo de unirse a OX40 y de neutralizar la actividad de OX40. El efecto de las sustituciones de cualquier aminoácido, adiciones y/o cancelaciones puede ser fácilmente probado por un experto en la materia, por ejemplo mediante el uso de los métodos acá descritos, en particular en los ejemplos, para determinar la unión de OX40 y la inhibición de la interacción OX40/OX40L. De acuerdo con lo anterior, la presente invención suministra un anticuerpo que tiene especificidad por OX40 humano que comprende uno más CDR seleccionados de CDRH-1 (SEQ ID NO:1), CDRH-2 (SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:20), CDRH-3 (SEQ ID NO:3), CDRL-1 (SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:21), CDRL-2 (SEQ ID NO:5) y CDRL-3 (SEQ ID NO:6) en los cuales uno o más aminoácidos en uno o más de los CDR ha sido sustituido con otro aminoácido, adecuadamente un aminoácido similar como se define a continuación. En una modalidad, la presente invención suministra un anticuerpo que tiene especificidad por OX40 humano que comprende CDRH-1 (SEQ ID NO:1), CDRH-2 (SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:20), CDRH-3 (SEQ ID NO:3), CDRL-1 (SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:21), CDRL-2 (SEQ ID NO:5) y CDRL-3 (SEQ ID NO:6) como se muestra en la Figura 1(c), por ejemplo en los cuales uno o más aminoácidos en uno o más de los CDR han sido sustituidos con otro aminoácido, tal como un aminoácido similar como se define acá más adelante.

En una modalidad, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende tres CDR en donde la secuencia de CDRH-1 tiene por lo menos 60% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:1, CDRH-2 tiene por lo menos 60% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:2 y/o CDRH-3 tiene por lo menos 60% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:3. En otra modalidad, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende tres CDR en donde la secuencia de CDRH-1 tiene por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en SEQ ID:1, CDRH-2 tiene por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en SEQ ID:2 y/o CDRH-3 tiene por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en SEQ ID:3.

000010

“Identidad”, como se usa acá, indica que en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es idéntico entre las secuencias. “De forma similar”, como se usa acá, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina puede ser sustituida por isoleucina o valina. Otros aminoácidos que pueden a menudo ser sustituidos por otro incluyen pero no se limitan a:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
 - lisina, arginina y histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);
 - aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);
 - asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales de amida); y
 - cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen sulfuro).
- Los grados de identidad o similitud pueden ser fácilmente calculados (Biología Computacional Molecular, Lesk, A.M., ed., Prensa Universidad de Oxford, New York, 1988; Biocomputación. Informática y Proyectos de Genoma, Smith, D.W., ed., Prensa Académica, New York, 1993; Análisis de Computador de Datos de Secuencia, Parte 1, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Prensa Humana, New Jersey, 1994; Análisis de Secuencia en Biología Molecular, von Heinje, G., Prensa Académica, 1987, Análisis de Secuencia Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., Prensa M Stockton, New York, 1991, El software BLAST™ disponible de NCBI (Altschul, S.F. y otros, 1990, J. Mol. Biol. 215:403 a 410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266 a 272. Madden, T.L. y otros, 1996, Meth. Enzymol. 266:131 a 141; Altschul, S.F. y otros, 1997, Ácidos Nucleicos Res. 25:3389 a 3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genoma Res. 7:649 a 656).

En una modalidad, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende tres CDR en donde la secuencia de CDRL-1 tiene por lo menos 60% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:4, CDRL-2 tiene por lo menos 60% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:5 y/o CDRL-3 tiene por lo menos 60% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:6. En otra modalidad, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena ligera en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende tres CDR en donde la secuencia de CDRL-1 tiene por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en SEQ ID:4, CDRL-2 tiene por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en SEQ ID:5 y/o CDRL-3 tiene por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en SEQ ID:6.

En una modalidad, el anticuerpo suministrado acá es un anticuerpo monoclonal.

En una modalidad, el anticuerpo suministrado acá es un anticuerpo quimérico.

En una modalidad, el anticuerpo suministrado por la presente invención es una molécula de anticuerpo injertado de CDR que comprende uno o más de los CDR suministrados en las SEQ ID NOS:1, 2, 3, 4, 5, 6, 20 y/o 21 (Figura 1(c)) o variantes de los mismos. Como se usa acá, el término “molécula de anticuerpo injertado de CDR” se refiere a una molécula de anticuerpo en donde la cadena pesada y/o ligera contiene uno o más CDR (incluyendo, si se desea, uno o más

000011

CDR modificados) a partir de un anticuerpo donante (por ejemplo, anticuerpo monoclonal de murina) injertado en una estructura de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptador (por ejemplo, anticuerpo humano). Para una revisión, ver Vaughan *y otros*, *Biotecnología de la Naturaleza*, 16, 535 a 539, 1998. En una modalidad en lugar de todo el CDR siendo transferido, sólo uno o más de los residuos determinantes de especificidad de cualquiera de los CDR acá descritos anteriormente son transferidos a la estructura de anticuerpo humano (ver por ejemplo, Kashmiri *y otros*, 2005, *Métodos*, 36, 25 a 34). En una modalidad, sólo los residuos determinantes de la especificidad de uno o más de los CDR acá descritos anteriormente son transferidos a la estructura de anticuerpo humano. En otra modalidad, sólo los residuos determinantes de la especificidad de cada uno de los CDR descritos anteriormente son transferidos a la estructura de anticuerpo humano.

Cuando los CDR o los residuos determinantes de especificidad son injertados, cualquier secuencia aceptadora de estructura de región variable apropiada puede ser utilizada con relación a la clase/tipo del anticuerpo donante del cual se derivan los CDR, incluyendo regiones de estructura de ratón, primate y humano. Adecuadamente, el anticuerpo injertado en CDR de acuerdo con la presente invención tiene un dominio variable que comprende regiones de estructura de aceptador humano así como uno o más de los CDR o residuos determinantes de especificidad descritos anteriormente. Por lo tanto, en una modalidad se suministra un anticuerpo injertado en CDR neutralizador en donde el dominio variable comprende regiones de estructura de aceptador humano y CDR donantes no humano.

Los ejemplos de las estructuras humanas que pueden ser usadas en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat *y otros*, *supra*). Por ejemplo, KOL y NEWM pueden ser utilizados para la cadena pesada, REI puede ser usado para la cadena ligera y EU, LAY y POM pueden ser usados para tanto la cadena pesada como la cadena ligera. Alternativamente, las secuencias de línea germinal humana pueden ser usadas; estas están disponibles en <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>

En un anticuerpo injertado en CDR de la presente invención, las cadenas aceptadoras pesadas o ligeras no necesitan ser derivadas del mismo anticuerpo y pueden, si se desea, comprender cadenas de compuesto que tienen regiones de estructura derivadas de cadenas diferentes.

La región de estructura adecuada para la cadena pesada del anticuerpo injertado en CDR de la presente invención se deriva del subgrupo VH3 humano secuencia 1-3 3-07 junto con JH4. De acuerdo con esto, se suministra un anticuerpo injertado en CDR que comprende al menos un CDR donante no humano en donde la región de estructura de cadena pesada se deriva del subgrupo VH3 humano secuencia 1-3 3-07 junto con JH4. La secuencia de JH4 humano es como sigue: (YFDY)WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:22). El YFDY modifica parte del CDR-H3 y no es parte de la estructura 4 (Ravetch, JV. *y otros*, 1981, *Célula*, 27, 583 a 591).

La región de estructura adecuada para la cadena ligera del anticuerpo injertado en CDR de la presente invención se deriva de la línea germinal del subgrupo VK1 secuencia 2-1 1-02 junto con JK4. De acuerdo con esto, se suministra un anticuerpo injertado en CDR neutralizador que comprende al

000012

menos un CDR donante no humano en donde la región de estructura de cadena ligera se deriva del subgrupo humano secuencia 2-1 1-02 junto con JK4. La secuencia JK1 es como sigue: (WT)FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 23). El motivo del WT es parte del CDR-L3 y no es parte de la estructura 4 (Hieter, P.A., *y otros*, 1982, J. Biol. Chem., 257, 1516 a 1522).

También, en un anticuerpo injertado en CDR de la presente invención, las regiones de estructura no necesitan tener exactamente la misma secuencia que aquellas del anticuerpo aceptador. Por ejemplo, residuos inusuales pueden ser cambiados a residuos que ocurren más frecuentemente para esa clase o tipo de cadena aceptadora. Alternativamente, los residuos seleccionados en las regiones de estructura aceptadoras pueden ser cambiados de modo tal que corresponden al residuo encontrado en la misma posición en el anticuerpo donante (ver Reichmann *y otros*, 1998, Naturaleza, 332, 323 a 324). Dichos cambios deben mantenerse al mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donante. Un protocolo para seleccionar residuos en las regiones de estructura de aceptador que pueden necesitar ser cambiadas se define en WO91/09967.

Adecuadamente, en una molécula de anticuerpo injertado en CDR de la presente invención, si la cadena pesada de aceptador tiene el VH3 humano secuencia 1-3 3-07 junto con JH4, entonces las regiones de estructura de aceptador de la cadena pesada comprende, adicional a uno o más CDR donantes, un residuo donante en por lo menos una de las posiciones 37, 73, 78 o 94 (de acuerdo con Kabat *y otros*, (supra)). De acuerdo con esto, se suministra un anticuerpo injertado en CDR, en donde al menos los residuos en las posiciones 37, 73, 78 y 94 del dominio variable de la cadena pesada son residuos donantes.

Adecuadamente, en una molécula de anticuerpo injertado en CDR de acuerdo con la presente invención, si la cadena ligera aceptadora tiene el subgrupo humano VK1 secuencia 2-1 1-02 junto con JK4, entonces las regiones de estructura aceptadoras de la cadena ligera comprende, adicional a uno o más CDR donantes, un residuo donante en por lo menos una de las posiciones 64 o 71. De acuerdo con esto, se suministra un anticuerpo injertado en CDR, en donde al menos los residuos en las posiciones 64 y 71 del dominio variable de la cadena ligera son residuos donantes.

Los residuos donantes son residuos a partir del anticuerpo donante, es decir, el anticuerpo del cual originalmente se derivaron los CDR.

En una modalidad, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en la Figura 1 (b) SEQ ID NO:9.

Se apreciará que una o más sustituciones de aminoácidos, adiciones y/o cancelaciones pueden ser hechas a los dominios variables de anticuerpo, suministradas por la presente invención, si alterar significativamente la habilidad del anticuerpo de unirse al OX40 y de neutralizar la actividad del OX40. El efecto de cualquier sustitución de aminoácidos, adiciones y/o cancelaciones pueden ser probadas fácilmente por una persona experta en la materia, por ejemplo mediante el uso de los métodos acá descritos, en particular los Ejemplos, para determinar la unión del OX40 y el bloqueo del ligando.

En otra modalidad, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable comprende una secuencia que tiene al menos 60% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:9. En

000013

una modalidad, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:9.

En una modalidad, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en la Figura 1 (a) SEQ ID NO:7.

En otra modalidad, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 60% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:7. En una modalidad, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:7.

En una modalidad, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en la Figura 1 (a) SEQ ID NO:9 y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en la Figura 1 (a) SEQ ID NO:7.

En otra modalidad de la invención, un anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos 60% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:9 y el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 60% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:7. Adecuadamente, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:9 y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:7.

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención pueden comprender una molécula completa de anticuerpo que tiene cadenas pesadas y ligeras de longitud completa o un fragmento de las mismas y puede ser, pero no se limita a Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio simple (por ejemplo, VH o VL o VHH), scFv, anticuerpos bi, tri o tetravalentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos u fragmentos de unión epítipo de cualquiera de los anteriores (ver por ejemplo Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126 a 1136; Adair y Lawson, 2005, Revisiones de Diseño de Droga – En línea 2(3), 209 a 217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpo son bien conocidos en el estado de la técnica (ver por ejemplo Verma y otros, 1998, Diario de Métodos Inmunológicos, 216, 165 a 181). Otros fragmentos de anticuerpo para su uso en la presente invención incluyen los fragmentos de Fab y Fab' descritos en las solicitudes de patente Internacional WO205/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender especificidades múltiples o pueden ser monoespecíficos (ver por ejemplo WO92/22853 y WO05/113605).

000014

En una modalidad, el anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación se suministra como una proteína de fusión de anticuerpo de unión de OX40 la cual comprende una fracción de inmunoglobulina, por ejemplo un fragmento Fab o Fab', o uno o dos anticuerpos de dominio simples (dAb) ligados directa o indirectamente al mismo, por ejemplo como se describe en WO2009/040562.

En una modalidad, la proteína de fusión comprende dos anticuerpos de dominio, por ejemplo como un emparejamiento pesado variable (VH) y ligero variable (VL), ligado opcionalmente por una unión de disulfuro.

En una modalidad, el elemento Fab o Fab' de la proteína de fusión tiene la misma especificidad o similar al anticuerpo o anticuerpos de dominio simple. En una modalidad, el Fab o Fab' tiene una especificidad diferente al anticuerpo o anticuerpos de dominio simple, que es decir que la proteína de fusión es multivalente. En una modalidad, una proteína de fusión multivalente de acuerdo con la presente invención tiene un sitio de unión a albúmina, por ejemplo un par VH/VL allí suministra un sitio de unión a albúmina.

Los dominios de región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si están presentes, pueden ser seleccionados con relación a la función propuesta de la molécula de anticuerpo, y en particular las funciones efectoras que pueden ser requeridas. Por ejemplo, los dominios de región constante pueden ser dominios IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanos. En particular, los dominios de región constante IgG humano pueden ser utilizados, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo se pretende para usos terapéuticos y se requieren las funciones efectoras. Alternativamente, los isotipos IgG2 e IgG4 pueden ser utilizados cuando la molécula de anticuerpo se pretende para propósitos terapéuticos y no se requieren las funciones efectoras del anticuerpo, por ejemplo, para simplemente bloquear la actividad del OX40. Se apreciará que las variantes de secuencia de estos dominios de región constante también pueden ser utilizados. Por ejemplo, se pueden utilizar las moléculas IgG4 en las cuales la serina en la posición 241 ha sido cambiada a prolina como se describe en Angal y otros, *Inmunología Molecular*, 1993, 30 (1), 105 a 108. También se entenderá por un experto en la materia que los anticuerpos pueden someter una variedad de modificaciones postranslacionales. El tipo y la extensión de estas modificaciones a menudo dependen de la línea de célula huésped utilizada para expresar el anticuerpo así como las condiciones de cultivo. Dichas modificaciones pueden incluir variaciones en glicosilación, oxidación de metionina, formación de diqueterazina, isomeración de aspartato y deamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de residuo básico de terminal carboxi (tal como lisina o arginina) debido a la acción de las carboxipeptidasas (como se describe en Harris, RJ. *Diario de Cromatografía* 705:129 a 134, 1995). De acuerdo con esto, la lisina de terminal C de la cadena pesada de anticuerpo dada en la Figura 1 (f), SEQ ID NO: 15 puede estar ausente.

En una modalidad, la cadena pesada de anticuerpo comprende un dominio CH1 y la cadena ligera de anticuerpo comprende un dominio CL, bien sea kappa o lambda.

En una modalidad, el anticuerpo suministrado por la presente invención es un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano en el cual la región constante de cadena pesada comprende una región de bisagra modificada.

000015

De acuerdo con esto, la presente invención suministra un anticuerpo en el cual la cadena pesada comprende o consiste de la secuencia dada en la Figura 1 (f), SEQ ID NO:15.

Se apreciará que una o más sustituciones de aminoácido, adiciones y/o cancelaciones pueden ser hechas a los dominios variables y/o constantes del anticuerpo suministrados por la presente invención sin alterar significativamente la habilidad del anticuerpo de unirse a OX40 y de neutralizar la actividad de OX40. El efecto de cualquier sustitución de aminoácido, adiciones y/o cancelaciones pueden ser probadas fácilmente por un experto en el estado de la técnica, por ejemplo mediante el uso de los métodos descritos acá, en particular en los Ejemplos, para determinar la unión a OX40 y el bloqueo de la interacción OX40/OX40L.

En una modalidad de la invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en donde la cadena pesada comprende una secuencia que tiene por lo menos 60% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:15. Adecuadamente, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en donde la cadena pesada comprende una secuencia que tiene por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:15.

En una modalidad, una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la Figura 1 (d), SEQ ID NO:11.

En una modalidad de la invención, el anticuerpo comprende una cadena ligera, en donde la cadena ligera comprende una secuencia que tiene por lo menos 60% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:11. Adecuadamente, el anticuerpo comprende una cadena ligera, en donde la cadena ligera comprende una secuencia que tiene por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:11.

En una modalidad, la presente invención suministra un anticuerpo en el cual la cadena pesada comprende o consiste de la secuencia dada en la SEQ ID NO:15 y la cadena ligera comprende o consiste de la secuencia dada en la SEQ ID NO:11.

En una modalidad de la invención, un anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos 60% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:15 y la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 60% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:11. Generalmente, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en donde la cadena pesada comprende una secuencia que tiene por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:15 y una cadena ligera, en donde la cadena ligera comprende una secuencia que tiene por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud a la secuencia dada en SEQ ID NO:11.

Las moléculas biológicas, tales como anticuerpos o fragmentos, contienen grupos funcionales ácidos y/o básicos, dándole así a la molécula una carga positiva neta o negativa. La cantidad de la carga "observada" general dependerá de la secuencia absoluta de aminoácido de la entidad, el ambiente local de los grupos cargados en la estructura 3D y las condiciones ambientales de la molécula. El punto isoelectrico (pI) es el pH al cual una molécula particular o superficie accesible de solvente del mismo no lleva carga eléctrica neta. En una modalidad,

000016

el anticuerpo o fragmento de acuerdo con la presente divulgación tiene un punto isoeléctrico (pI) de por lo menos 7. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento tiene un punto isoeléctrico de por lo menos 8, tal como 8.5, 9.6, 8.7, 8.8 o 9.

Los anticuerpos y fragmentos de OX40 de la invención, han sido modificados para tener un punto isoeléctrico apropiado. Esto puede llevar a anticuerpos y/o fragmentos con propiedades más robustas, en particular perfiles de solubilidad y/o estabilidad adecuados y/o características de purificación mejoradas.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención suministra un anticuerpo OX40 humanizado modificado para tener un punto isoeléctrico diferente al del anticuerpo CA044_00026 identificado originalmente. El anticuerpo puede, por ejemplo ser modificado por medio del reemplazo de un residuo de aminoácido tal como el reemplazo de un residuo de aminoácido ácido con uno o más residuos de aminoácido básicos. Alternativamente, los residuos de aminoácido básicos pueden ser introducidos o los residuos de aminoácido básicos pueden ser removidos. Alternativamente, si la molécula tiene un valor pI inaceptablemente alto los residuos ácidos pueden ser introducidos para reducir el pI, como se requiera. El pI objetivo del anticuerpo o fragmento modificado puede deseablemente ser, por ejemplo 8 o por encima, tal como 8.5 o 9. Es importante que cuando se manipula el pI se debe tener cuidado para retener la actividad deseable del anticuerpo o fragmento. Por lo tanto, en una modalidad, el anticuerpo o fragmento modificado tiene la misma o sustancialmente la misma actividad que el anticuerpo o fragmento "no modificado".

Programas tales como ****ExPASy**
http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html, y http://www.iut-arles.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html, pueden ser usados para pronosticar el punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento.

También se suministra mediante la presente invención una región específica o epítipo de OX40 humano la cual se une por un anticuerpo suministrado por la presente invención, en particular un anticuerpo que comprende la secuencia gH2 de cadena pesada (SEQ ID NO:9) y/o la secuencia gL8 de cadena ligera (SEQ ID NO:7).

Esta región o epítipo específica del polipéptido OX40 humano puede ser identificada por cualquier método de mapeo de epítipo adecuado conocido en estado de la técnica en combinación con cualquiera de los anticuerpos suministrados por la presente invención. Los ejemplos de dichos métodos incluyen la detección de péptidos de longitudes variables derivados de OX40 para unirse al anticuerpo de la presente invención con el fragmento más pequeño que puede unirse específicamente al anticuerpo que contiene la secuencia del epítipo reconocido por el anticuerpo. Los péptidos OX40 pueden ser producidos sintéticamente o por medio de digestión proteolítica del polipéptido OX40. Los péptidos que unen el anticuerpo pueden ser identificados por, por ejemplo, análisis espectrométrico de masa. En otro ejemplo, la espectrometría NMR o cristalografía de rayos X pueden ser utilizadas para identificar la unión epítipo por un anticuerpo de la presente invención. Una vez identificado, el fragmento epitópico que se une a un anticuerpo de la presente invención puede ser utilizado, si se requiere, como un inmunógeno para obtener anticuerpos antagonistas adicionales los cuales se unen al mismo epítipo.

000017

Los anticuerpos que bloquean la unión de un anticuerpo de acuerdo con la presente invención en particular, un anticuerpo que comprende la secuencia gH2 de cadena pesada (SEQ ID NO:9) y la secuencia gL8 de cadena ligera (SEQ ID NO:7) puede ser similarmente útil en la actividad antagonista de OX40. De acuerdo con esto, la presente invención también suministra un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por el OX40 humano, el cual bloquea la unión de cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente al OX40 y/o se bloquea la unión del OX40 por medio de cualquiera estos anticuerpos. En una modalidad, dicho anticuerpo se une al mismo epítipo como un anticuerpo descrito anteriormente. En otra modalidad, el anticuerpo neutralizador de bloqueo se une a un epítipo el cual bordea y se superpone con el epítipo unido por un anticuerpo descrito anteriormente. En otra modalidad, el anticuerpo neutralizador de bloqueo de este aspecto de la invención no se une con el mismo epítipo como un anticuerpo de la presente invención o un epítipo que bordea y/o se superpone con dicho epítipo.

Los anticuerpos de bloqueo pueden ser identificados usando cualquier método adecuado en el estado de la técnica, por ejemplo mediante el uso de ensayos ELISA o BIAcore de competencia donde la unión del anticuerpo de bloqueo al OX40 humano previene la unión de un anticuerpo de la presente invención o viceversa.

En una modalidad, se suministra un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, el cual bloquea la unión de un anticuerpo cuya cadena pesada comprende la secuencia gH2 (SEQ ID NO:9) y cuya cadena ligera comprende la secuencia gL8 (SEQ ID NO:7) al OX40 humano. En una modalidad, los anticuerpos de bloqueo suministrados por la presente invención inhiben la unión de un anticuerpo que comprende la secuencia gH2 de cadena pesada (SEQ ID NO:9) y la secuencia gL8 de cadena ligera (SEQ ID NO:7) por más del 80%, por ejemplo por más del 85%, tal como por más del 90%, en particular por más del 95%.

Alternativa o adicionalmente, los anticuerpos antagonistas de acuerdo con este aspecto de la invención puede ser bloqueado de unirse al OX40 humano por medio de un anticuerpo que comprende la secuencia gH2 de cadena pesada (SEQ ID NO:9) y la secuencia gL8 de cadena ligera (SEQ ID NO:7). Por lo tanto, también se suministra una molécula de anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano la cual es bloqueada de unirse al OX40 humano por medio de un anticuerpo que comprende la secuencia gH2 de cadena pesada (SEQ ID NO:9) y la secuencia gL8 de cadena ligera (SEQ ID NO:7). En una modalidad, los anticuerpos antagonistas suministrados en este aspecto de la invención son inhibidos de unirse al OX40 humano por medio de un anticuerpo que comprende la secuencia gH2 de cadena pesada (SEQ ID NO:9) y la secuencia gL8 de cadena ligera (SEQ ID NO:7) por no más del 80%, por ejemplo por no más del 85%, tal como por no más del 90%, en particular por no más del 95%.

En una modalidad, los anticuerpos de bloqueo suministrados por la presente invención son completamente humanos. En una modalidad, los anticuerpos de bloques suministrados por la presente invención son humanizados. En una modalidad, los anticuerpos de bloqueo suministrados por la presente invención tienen una afinidad por OX40 humano de 100pM o mejor.

000018

En una modalidad, los anticuerpos de bloqueo suministrados por la presente invención tienen una afinidad por OX40 humana de 50pM o mejor.

En una modalidad, el anticuerpo de bloqueo tiene un punto isoeléctrico de al menos 7, por ejemplo al menos 8, tal como 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9 o 9.0.

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención adecuadamente tienen una afinidad de unión alta, en particular picomolar. La afinidad puede ser medida usando cualquier método adecuado conocido en el estado de la técnica, incluyendo BIAcore, como se describe en los Ejemplos acá, usando OX40 aislado natural o recombinante o una proteína/polipéptido de fusión adecuada. En un ejemplo, la afinidad es medida usando dominio extracelular de OX40 humano recombinante como se describe en los Ejemplos de este documento. En un ejemplo, el dominio extracelular de OX40 humano recombinante usado es un atenuador, por ejemplo un atenuador de fusión Fc. Adecuadamente, las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen una afinidad de unión por el OX40 humano aislado de aproximadamente 200pM o mejor. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o mejor. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 50 pM o mejor. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 40 pM o mejor. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 30 pM o mejor. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente invención es completamente humana o humanizada y tiene una afinidad de unión de aproximadamente 100pM o mejor.

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención adecuadamente tienen una afinidad de unión alta por el OX40 humano expresado en la superficie de las células T activadas, por ejemplo afinidad nanomolar o picomolar. La afinidad puede ser medida usando cualquier método adecuado conocido en el estado de la técnica, que incluye el método como se describe en los Ejemplos de este documento usando las células T humanas CD4+ OX40+ activadas. En particular, las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen una afinidad de unión para la superficie de célula de OX40 humano expresado de aproximadamente 2nM o mejor. En un ejemplo, las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen una afinidad de unión para la superficie de célula de OX40 humano expresado de aproximadamente 1.5 nM o mejor. En otro ejemplo, las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen una afinidad de unión para la superficie de célula de OX40 humano expresado de aproximadamente 1.2 nM o mejor. En una modalidad, se suministra una molécula de anticuerpo completamente humana o humanizada la cual tiene una afinidad de unión de aproximadamente 2nM o mejor para OX40 expresado de superficie de célula humana.

Se apreciará que la afinidad de los anticuerpos suministrados por la presente invención puede ser alterada usando cualquier método adecuado conocido en el estado de la técnica. La presente invención por lo tanto también se relaciona con variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente invención, las cuales tienen una afinidad mejorada para OX40. Dichas variantes pueden ser obtenidas mediante un número de protocolos de maduración de

000019

afinidad que incluyen mutar los CDR (Yang *y otros*, J. Mol. Biol., 254, 392 a 403, 1995), intercambio de cadena (Marks *y otros*, Bio/Tecnología, 10, 779 a 783, 1992), uso de cepas mutadoras de *E. Coli* (Low *y otros*, J. Mol. Biol., 250, 359 a 368, 1996), cambio de ADN (Patten *y otros*, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724 a 733, 1997), muestra de fagos (Thompson *y otros*, J. Mol. Biol., 256, 77 a 88, 1996) y PCR sexual (Cramer *y otros*, Naturaleza, 391, 288 a 291, 1998). Vaughn *y otros* (*supra*) discute estos métodos de maduración de afinidad.

En una modalidad, las moléculas de anticuerpo de la presente invención bloquea la interacción entre OX40 y OX40L. Varios ensayos disponibles para determinar la habilidad de un anticuerpo para bloquear esta interacción son descritos en los ejemplos de este documento. En una modalidad, la presente invención suministra un anticuerpo neutralizador que tiene especificidad por el OX40 humano el cual es capaz de inhibir la unión del OX40L humano (probado a una concentración final de 2 µg/ml) a las células CD4+ OX40+ humanas activadas por 50% a una concentración de menos de 5nM. En una modalidad, el OX40 humano usado en el ensayo es OX40 humano natural. En una modalidad, el OX40 usado en el ensayo es OX40 humano recombinante. En una modalidad, el anticuerpo neutralizador es un anticuerpo humano humanizado o completamente humano.

Si se desea, un anticuerpo para su uso en la presente invención puede ser conjugado a una o más moléculas efectoras. Se apreciará que la molécula efectora puede comprender una molécula efectora simple o dos o más de dichas moléculas ligadas de manera que forman una fracción simple que puede ser unida a los anticuerpos de la presente invención. Donde se desee obtener un fragmento de anticuerpo ligado a una molécula efectora, este puede ser preparado por medio de procedimientos estándar químicos o de ADN recombinante en los cuales el fragmento de anticuerpo es ligado bien sea directamente o por medio de un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar dichas moléculas efectoras a los anticuerpos son bien conocidas en el estado de la técnica (ver Hellstrom *y otros*, Entrega Controlada de Droga, 2ª Ed., Robinson *y otros*. Eds., 1987, pp. 623 a 53; Thorpe *y otros*, 1982, Immunol. Rev., 62: 119 a 58 y Dubowchik *y otros*, 1999, Farmacología y Terapéutica, 83, 67 a 123). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO03031581. Alternativamente, donde la molécula efectora es una proteína o polipéptido la unión puede lograrse usando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo como se describe en WO 86/01533 y EP0392745.

El término molécula efectora como se usa acá incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, drogas, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros que se presentan sintética o naturalmente, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, por ejemplo ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionucleidos, particularmente radioyodo, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos reporteros tales como compuestos fluorescentes o compuestos los cuales pueden ser detectados por espectroscopía NMR o ESR.

Ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos que incluyen cualquier agente que es perjudicial para (por ejemplo, mata) las células. Los ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas,

000020

estaurosporina, maitansinoides, espongistatinas, rizoxin, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenoposide, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dihidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

Las moléculas efectoras incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, clorambucil, tioepa, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, platino busulfán, dibromomannitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-dichlorodiamina (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionucleidos quelados como ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuth ^{213} , Californio ^{252} , Iridio ^{192} y Tungsteno ^{188} /Renio ^{188} , o drogas tales como, pero no limitado a, alquilfosfolinas, inhibidores de la topoisomerasa I, taxanos y suramina. Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina de la difteria, una proteína como la insulina, factor de necrosis tumoral α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador tisular del plasminógeno, un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina, o, un modificador de la respuesta biológica, como una linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) o otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles por ejemplo en diagnóstico. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminescentes, materiales bioluminescentes, nucleidos radioactivos, metales que emiten positrón (para su uso en tomografía de emisión de positrón), y iones de metal paramagnético no radioactivo. Ver generalmente la Patente de EE.UU. No. 4.741.900 para iones de metal que pueden ser conjugados a anticuerpos para usar como diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa, fosfatasa alcalina, beta galactosidasa, o acetilcolinesterasa, los grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina, los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína dichlorotriazinilamina, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales

000021

bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aequorin y los nucleidos radiactivos adecuados son ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la vida media del anticuerpo *in vivo*, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o mejorar de un anticuerpo a lo largo de una barrera epitelial al sistema inmune. Los ejemplos de las moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión de albúmina o compuestos de unión de albúmina tal como aquellos descritos en WO05/117984.

Donde la molécula efectora es un polímero, éste puede, en general, ser un polímero que se presenta sintética o naturalmente, por ejemplo un polialquileno de cadena ramificada o derecha sustituida, polialquilenilo o polímero polioxilquileno o un polisacárido sin ramificar o ramificado, por ejemplo un polisacárido homo o hetero.

Los sustituyentes opcionales específicos, los cuales pueden estar presentes en los polímeros sintéticos anteriormente mencionados, incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi.

Los ejemplos específicos de los polímeros sintéticos incluyen opcionalmente poli(etilenglicol) de cadena ramificada o derecha sustituta, poli(propilenglicol) poli(vinilalcohol) o derivados de los mismos, especialmente opcionalmente poli(etilenglicol) sustituido tal como metoxipoli(etilenglicol) de derivados del mismo.

Los polímeros específicos que se presentan naturalmente incluyen, lactosa, amilosa, dextran, glicogen o derivados de los mismos.

“Derivados” como se usa en este documento se pretende para incluir derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos selectivos de tiol tal como maleimidas y similares. El grupo reactivo puede estar ligado directamente o a través de un segmento enlazador al polímero. Se apreciará que el residuo de dicho grupo en algunos casos formará parte del producto como el grupo enlazador entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero puede variar si se desea, pero generalmente tiene un peso molecular promedio que se encuentra en el rango de 500Da a 50000Da, por ejemplo de 5000 a 40000Da tal como de 20000 a 40000Da. El tamaño de polímero puede en particular ser seleccionado en la base del uso pretendido del producto, por ejemplo la habilidad de localizar ciertos tejidos tales como tumores o vida media de la extensión de circulación (para revisión, ver Chapman, 2002, Revisión de Entrega Avanzada de Medicamentos, 54, 531 a 545). Por lo tanto, por ejemplo, donde el producto se pretende para dejar la circulación y penetrar tejido, por ejemplo para su uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo con un peso molecular de aproximadamente 5000Da. Para aplicaciones donde el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular mayor, por ejemplo que tiene un peso molecular en el rango de 20000Da a 40000Da.

Los polímeros adecuados incluyen un polímero polialquileno, tal como un poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado de los mismos, y especialmente con un peso molecular en el rango de aproximadamente 15000Da a aproximadamente 40000Da.

000022

En un ejemplo, los anticuerpos para su uso en la presente invención están unidos a porciones de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas PEG pueden estar unidas a través de cualquier cadena lateral de aminoácido disponible o grupo funcional de aminoácido terminal ubicado en el fragmento del anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo libre amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo. Dichos aminoácidos pueden ocurrir naturalmente en el fragmento de anticuerpo o pueden ser modificados en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (ver por ejemplo US 5.219.996; US 5.667.425; WO98/25971). En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado en donde la modificación es la adición del extremo de terminal C de uno o más aminoácidos de cadena pesada para permitir la unión de una molécula efectora. Adecuadamente, los aminoácidos adicionales forman una región de bisagra modificada que contiene uno o más residuos de cisteína a los cuales se puede unir la molécula efectora. Los sitios múltiples pueden ser usados para unir dos o más moléculas PEG.

Las moléculas PEG adecuadas están ligadas covalentemente a través de un grupo tiol de por lo menos un residuo de cisteína ubicado en el fragmento de anticuerpo. Cada una de las moléculas de polímero unidas al fragmento de anticuerpo modificado puede estar ligada covalentemente al átomo de sulfuro de un residuo de cisteína ubicado en el fragmento. La unión covalente generalmente será una unión de disulfuro o, en particular, una unión de sulfuro-carbono. Donde se usa un grupo tiol como las moléculas efectoras activadas apropiadamente al punto de unión, por ejemplo se pueden utilizar los derivados selectivos de tiol tal como derivados de maleimidas y cisteínas. Un polímero activado puede ser usado como el material iniciador en la preparación de los fragmentos de anticuerpo de polímero modificado como se describió anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contiene un grupo reactivo tiol tal como un ácido α -halocarboxílico o éster, por ejemplo yodoacetamida, una imida, por ejemplo maleimida, una sulfona de vinilo o un disulfuro. Dichos materiales iniciadores pueden ser obtenidos comercialmente (por ejemplo de Nektar, antes Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EE.UU.) o pueden ser preparados de materiales iniciadores disponibles comercialmente usando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas PEG particulares incluyen 20K metoxi-PEG-amina (obtenible de Nektar, antes Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, antes Shearwater).

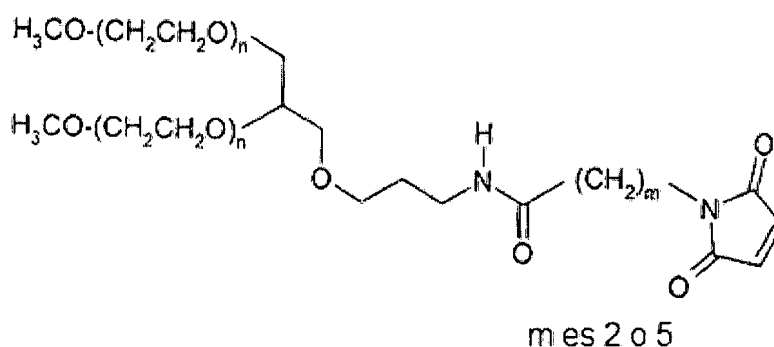
En una modalidad, el anticuerpo es un fragmento Fab modificado o diFab el cual es PEGlitado, es decir que tiene PEG (poli(etilenglicol)) unido covalentemente al mismo, por ejemplo de acuerdo con el método divulgado en EP 0948544 o EP1090037 [ver también "Química del Poli(Etilenglicol), Aplicaciones Biotécnicas y Biomédicas", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Química del Poli(Etilenglicol) y Aplicaciones Biológicas", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), Sociedad Americana de Química, Washington DC y "Técnicas de Acoplamiento de Proteína de Bioconjugación para las Ciencias Biomédicas", 1998, M. Aslam y A. Dent, Publicadores Grove, New York; Chapman, A. 2002, Revisiones de Entrega Avanzada de Medicamentos 2002, 54:531 a 545]. En un ejemplo, el PEG está unido a una

000023

cisteína en la región de bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab modificado de PEG tiene un grupo maleimida ligado covalentemente a un grupo tiol simple en una región de bisagra modificada. Un residuo de lisina puede estar ligado covalentemente al grupo maleimida y a cada uno de los grupos de amida y el residuo de lisina puede estar unido a un polímero metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20000Da. El peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab puede ser por lo tanto aproximadamente 40000Da.

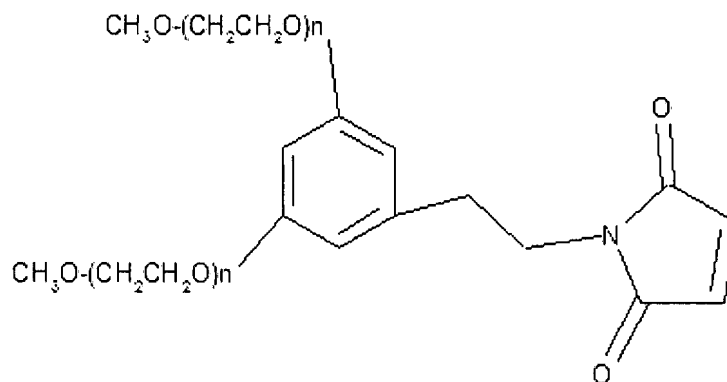
En una modalidad, la presente invención suministra una molécula de anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, el cual es un fragmento Fab modificado que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:9 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:7 y que tiene en el extremo de terminal C de su cadena pesada una región de bisagra modificada que contiene por lo menos un residuo de cisteína al cual se une una molécula efectora. Adecuadamente, la molécula efectora es PEG y es unida usando los métodos descritos en (WO98/25971 y WO2004072116 o en WO2007/003898). Adecuadamente, la molécula efectora está unida de tal forma que un grupo lisil-maleimida es unido al residuo de cisteína en el extremo de terminal C de la cadena pesada, y cada grupo amino del residuo lisil tiene unido covalentemente a él un residuo de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20000Da. El peso molecular total del PEG unido al anticuerpo es por lo tanto aproximadamente 40000Da. Las moléculas particulares de PEG incluyen 2-[3-(N-maleimido)propionamido]etilo amida de N,N'-bis(metoxipoli(etilenglicol) MW 20,000) lisina modificada, también conocido como PEG2MAL40K (obtenible de Nektar, antes Shearwater).

Las fuentes alternativas de enlazadores incluyen NOF los cuales suministran GL2-400MA2 (en donde en la estructura siguiente es 5) y GL2-400MA (en donde m es 2) y n es aproximadamente 450:



Eso es decir que cada PEG es aproximadamente 20000Da. Las moléculas efectoras alternativas del siguiente tipo:

000024



están disponibles del Dr. Reddy, NOF y Jenkem.

En una modalidad, se suministra un anticuerpo el cual es PEGilado (por ejemplo con un PEG descrito acá), unido a través de un residuo de aminoácido cisteína en o aproximadamente en el aminoácido 226 en la cadena, por ejemplo aminoácido 226 de la cadena pesada (mediante la numeración secuencial).

En una modalidad, la presente invención suministra una molécula de anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, el cual es un fragmento Fab modificado que tiene una cadena pesada que comprende que consiste de la secuencia dada en SEQ ID NO:15 y una cadena ligera que comprende o que consiste de la secuencia dada en SEQ ID NO:11 y que tiene una molécula efectora unida a la cisteína en la posición 226 de cadena pesada (numeración lineal de SEQ ID NO:15). Adecuadamente, la molécula efectora es PEG y es unida usando los métodos descritos en (WO98/25971 y WO2004072116 o en WO2007/003898) y un grupo de lisil-maleimida es unido al residuo de cisteína en la posición 226 de la cadena pesada (SEQ ID NO:15), y cada grupo amino del residuo lisil se ha unido covalentemente a un residuo de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20000Da. El peso molecular total del PEG unido al anticuerpo es por lo tanto aproximadamente 40000Da. Las moléculas particulares de PEG incluyen 2-[3-(N-maleimido)propionamido]etilo amida de N,N'-bis(metoxipoli(etilenglicol) MW 20,000) lisina modificada, también conocido como PEG2MAL40K (obtenible de Nektar, antes Shearwater). Adecuadamente, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab' modificado PEGilado como se muestra en la Figura 2. Esta molécula PEGilada se refiere acá como A26Fab'-PEG.

En otro ejemplo, las moléculas efectoras pueden ser unidas a fragmentos de anticuerpo usando los métodos descritos en las solicitudes WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171.

La presente invención también suministra una secuencia de ADN aislado que codifica la cadena pesada y/o ligera de una molécula de anticuerpo de la presente invención. Adecuadamente, la secuencia de ADN codifica la cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo de la presente invención. La secuencia de ADN de la presente invención puede comprender ADN sintético, por ejemplo producido por procesamiento químico, cADN, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos. Las secuencias de ADN que codifican una molécula de anticuerpo de la presente invención, pueden ser obtenidas por métodos bien conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican parte o todas las cadenas pesadas o ligeras del anticuerpo pueden ser sintetizadas como se desea a partir de las secuencias de

ADN determinadas o en la base de las secuencias de aminoácidos correspondientes.

El ADN codificador para las secuencias de estructura aceptadoras es ampliamente conocido para los expertos en la materia puede ser fácilmente sintetizado en la base de sus secuencias de aminoácido conocidas.

Las técnicas estándar de biología molecular pueden ser usadas para preparar secuencias de ADN codificador para la molécula de anticuerpo de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas pueden ser sintetizadas completamente o en parte usando técnicas de síntesis de oligonucleótido. La mutagenesis dirigida al sitio y las técnicas de reacción de cadena de polimerasa (PCR) pueden ser usadas como apropiadas.

Los ejemplos de las secuencias apropiadas se suministran en la Figura 1 (h) SEQ ID NO:8; Figura 1 (i) SEQ ID NO:10; Figura 1 (j) SEQ ID NO:13; Figura 1 (k) SEQ ID NO:14; Figura 1 (l) SEQ ID NO:17 y Figura 1 (m) SEQ ID NO:18. Los nucleótidos 1 a 63 en SEQ ID NO 18 y 1 a 63 en SEQ ID NO:14 codifican la secuencia OmpA del péptido de señal el cual escinde para dar una molécula de anticuerpo antagonista de la presente invención (el péptido de señal corresponde a los residuos de aminoácido 1 a 21 en la Figura 1 (g) SEQ ID NO:16 y 1 a 21 en la Figura (e) SEQ ID NO:12, respectivamente). La presente invención también suministra una secuencia de ADN aislado que codifica la cadena pesada del anticuerpo de la presente invención el cual comprende SEQ ID NO:17 o SEQ ID NO:18. La presente invención también suministra una secuencia de ADN aislado que codifica la cadena ligera de un anticuerpo de la presente invención, el cual comprende SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:14.

La presente invención también se relaciona a un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN de la presente invención. De acuerdo con esto, se suministra un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Adecuadamente, el vector de clonación o de expresión comprende dos secuencias de ADN, que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de la molécula de anticuerpo de la presente invención, respectivamente. Adecuadamente, un vector de acuerdo con la presente invención comprende las secuencias dadas en SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:18. Los nucleótidos 1 a 63 en SEQ ID NO:18 y 1 a 63 en SEQ ID NO:14 codifican la secuencia de péptido de señal de OmpA (residuos 1 a 21 en SEQ ID NO:16 y 1 a 21 en SEQ ID NO:12, respectivamente), el cual es escinde adecuadamente para dar una molécula de anticuerpo neutralizador de la presente invención. En un ejemplo, el vector comprende una secuencia intergénica entre las cadenas pesada y ligera, tal como IGS2 (ver WO03/048208). De acuerdo con esto, en una modalidad el vector de la presente invención comprende la secuencia dada en la Figura 1 (n) (SEQ ID NO:19).

Los métodos generales mediante los cuales los vectores pueden ser contruidos, métodos de transfección y métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la materia. En este respecto, se hace referencia a "Protocolos Actuales en Biología Molecular", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York y Maniatis Manual producido por Cold Spring Harbor Publishing.

También se suministra una célula huésped que comprende uno o más vectores de clonación o de expresión que comprenden una o más secuencias de

000026

ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Cualquier sistema de célula huésped/vector adecuado puede ser usado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Los sistemas bacteriano, por ejemplo *E. coli*, y otro microbiano pueden ser usados o sistemas de expresión de célula huésped eucariótica, por ejemplo de mamífero, pueden ser también utilizados. Las células huésped adecuadas de mamífero incluyen CHO, mieloma o células hibridoma.

La presente invención también suministra un proceso para la producción de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención que comprende el cultivo de una célula huésped que contiene un vector de la presente invención bajo condiciones adecuadas para llevar a la expresión de la proteína a partir del ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y el aislamiento de la molécula de anticuerpo.

La molécula de anticuerpo puede comprender únicamente un polipéptido de cadena pesada o ligera, en el cuyo caso sólo se necesitar usar un polipéptido de cadena pesada o de cadena ligera que codifica la secuencia para transfectar las células huésped. Para la producción de productos que comprende las cadenas pesada y ligera, la línea celular puede ser transfectada con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, un vector simple puede ser utilizado, el vector incluye secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada.

Los anticuerpos y fragmentos de acuerdo con la presente divulgación son expresados en buenos niveles de células huésped. Por lo tanto, las propiedades de los anticuerpos y/o fragmentos son optimizadas y propicias para procesamiento comercial.

Dado que los anticuerpos de la presente invención son útiles en el tratamiento y/o profilaxis de una condición patológica, la presente invención también suministra una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende una molécula de anticuerpo de la presente invención en combinación con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables. De acuerdo con esto, se suministra el uso de un anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento. La composición usualmente estará provista como una parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede adicionalmente comprender un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también suministra un proceso para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende adicionar y mezclar la molécula de anticuerpo de la presente invención junto con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

La molécula de anticuerpo puede ser el único ingrediente activo en la composición farmacéutica o de diagnóstico o puede estar acompañada por otros ingredientes activos que incluyen otros ingredientes de anticuerpo, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, anti-IL-1 β , anti-célula-T, anti-IFN γ o anti-LPS, o ingredientes no anticuerpo tal como xantinas. Otros ingredientes activos adecuados incluyen anticuerpos capaces de inducir tolerancia, por ejemplo, anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4.

000027

En una modalidad adicional, el anticuerpo, fragmento o composición de acuerdo con la divulgación es empleado en combinación con un agente farmacéuticamente activo adicional, por ejemplo un corticosteroide (tal como propionato de fluticasona) y/o agonista-beta-2 (tal como salbutamol, salmeterol o formoterol) o inhibidores del crecimiento y proliferación de la célula (tal como rapamicina, ciclofosfimida, metotrexato) o una alternativa de inhibidor CD28 y/o CD40. En una modalidad, el inhibidor es una molécula pequeña. En otra modalidad, el inhibidor es un anticuerpo específico al objetivo.

Las composiciones farmacéuticas adecuadamente comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de la invención. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" como se usa acá, se refiere a una cantidad de un agente terapéutico que se necesita para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o condición determinada, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la cantidad terapéuticamente efectiva puede ser estimada inicialmente bien sea en los ensayos de cultivo celular o en modelos animales, usualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal puede también ser utilizado para determinar el rango de concentración apropiado y la ruta de administración. Dicha información puede luego ser usada para determinar las dosis útiles y las rutas para administración en humanos.

La cantidad precisa terapéuticamente efectiva para un sujeto humano dependerá de la severidad del estado de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, peso y el género del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de la administración, combinación de la droga, sensibilidad de reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad puede ser determinada mediante experimentos de rutina y se encuentra dentro del juicio del médico. Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva se encontrara de 0.01 mg/kg a 50 mg/kg, por ejemplo, 0.1 mg/kg a 20 mg/kg. Las composiciones farmacéuticas pueden ser convenientemente presentadas en formas de dosis unitaria que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.

Las composiciones pueden ser administradas individualmente a un paciente o pueden ser administradas en combinación (por ejemplo, simultánea, secuencial o separadamente) con otros agentes, drogas u hormonas.

La dosis a la cual la molécula de anticuerpo de la presente invención es administrada depende de la naturaleza de la condición a ser tratada, el grado de la inflamación presente y si la molécula de anticuerpo está siendo usada profilácticamente o para tratar una condición existente.

La frecuencia de la dosis dependerá de la vida media de la molécula de anticuerpo y la duración de este efecto. Si la molécula de anticuerpo tiene una vida media corta (por ejemplo, 2 a 10 horas) puede ser necesario dar una o más dosis por día. Alternativamente, si la molécula de anticuerpo tiene una vida media larga (por ejemplo, 2 a 15 días) puede ser necesario sólo dar una dosis por día, una vez por semana o hasta una vez cada 1 o 2 meses.

El portador farmacéuticamente aceptable no debe inducir la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los portadores adecuados pueden ser macromoléculas largas metabolizadas lentamente tales como proteínas, polipéptidos, liposomas,

000028

polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.

Las sales farmacéuticamente aceptables pueden ser utilizadas, por ejemplo sales ácidas minerales, tal como hidroccloruros, hidrobromuros, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tal como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

Los portadores farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tal como agua, salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, las sustancias auxiliares, tal como agentes humectantes o emulsificadores o sustancias reguladoras de pH, pueden estar presentes en dichas composiciones. Dichos portadores permiten que las composiciones farmacéuticas sean formuladas como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes y suspensiones, para su ingestión por el paciente.

Las formas adecuadas para administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo por inyección o infusión, por ejemplo por inyección de bolo o infusión continua. Cuando los productos son por inyección o infusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo aceitoso o acuoso y puede contener agentes de formulación, tal como agentes suspensores, conservantes, estabilizadores y/o de dispersión. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para reconstitución antes de su uso con un líquido apropiado estéril.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden ser administradas directamente al sujeto. Los sujetos a ser tratados pueden ser animales. Sin embargo, en una o más modalidades, las composiciones se adaptan para administración en sujetos humanos.

Adecuadamente en las formulaciones de acuerdo con la presente divulgación, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoelectrico del anticuerpo o fragmento, por ejemplo si el pH de la formulación es 7 entonces un pI de 8 a 9 o por encima puede ser apropiado. Mientras que no se desea ligarse a la teoría, se cree que esto puede finalmente suministrar una formulación final con estabilidad mejorada, por ejemplo el anticuerpo o fragmento permanece en la solución.

En una modalidad, la formulación farmacéutica a un pH en el rango de 4.0 a 7.0 comprende: 1 a 200 mg/mL de un anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación, 1 a 100nM de un regulador, 0.001 a 1% de un surfactante, a) 10 a 500mM de un estabilizador, b) 10 a 500mM de un estabilizador y 5 a 500mM de un agente de toxicidad, o c) 5 a 500mM de un agente de toxicidad.

Por ejemplo, la formulación a aproximadamente pH6 puede comprender 1 a 50mg/mL del anticuerpo, 20mM de L-histadina HCl, 240 mM de trehalosa y 0.02% de polisorbato 20. Alternativamente, una formulación a aproximadamente pH 5.5 puede comprender 1 a 50 mg/mL del anticuerpo, 20nM de regulador citrato, 240nM sucrosa, 20nM de arginina, y 0.02% de polisorbato 20.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser administradas por un número de rutas que incluye, pero que no se limita a, oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, ver WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. Los hiposprays también se pueden utilizar para administrar las composiciones

farmacéuticas de la invención. Por lo general, las composiciones terapéuticas se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. Las formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección también pueden ser preparados.

La entrega directa de las composiciones generalmente será realizada por inyección, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente o intramuscularmente, o entregada al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones pueden también ser administradas en una lesión. El tratamiento de dosis puede ser un horario de dosis simple o un horario de dosis múltiple.

Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, este será susceptible a degradación en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, si la composición va a ser administrada por una ruta usando el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan el anticuerpo de degradación pero que liberen el anticuerpo una vez éste haya sido absorbido del tracto gastrointestinal.

Una discusión a fondo de los portadores farmacéuticamente aceptables está disponible en las Ciencias Farmacéuticas de Remington (Mack Publishing Company, NJ, 1991).

En una modalidad, la formulación es suministrada como una formulación para administraciones tópicas que incluyen inhalación.

Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles de medición que contienen gases propulsores o soluciones inhalables libres de gases propulsores. Los polvos inhalables de acuerdo con la divulgación que contienen la sustancia activa pueden consistir únicamente de las sustancias activas anteriormente mencionadas o de una mezcla de las sustancias activas anteriormente mencionadas con un excipiente fisiológicamente aceptable.

Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (por ejemplo, glucosa o arabinosa), disacáridos (por ejemplo, lactosa, sacarosa, maltosa), oligo y polisacáridos (por ejemplo, dextranos), polialcoholes (por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo, cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de estos con otro. Los mono o disacáridos son adecuadamente usados, el uso de lactosa o glucosa, particularmente pero no exclusivamente en la forma de sus hidratos.

Las partículas para deposición en el pulmón requieren un tamaño de partícula menor a 10 micras, tal como 1 a 9 micras por ejemplo de 0.1 a 5 μm , en particular de 1 a 5 μm . El tamaño de partícula del ingrediente activo (tal como el anticuerpo o fragmento) es de principal importancia.

Los gases propulsores que pueden ser usados para preparar aerosoles inhalables son conocidos en el estado de la técnica. Los gases propulsores adecuados se seleccionan de entre hidrocarburos tal como n-propano, n-butano o isobutano e halohidrocarburos tal como derivados clorinados o fluorinados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propulsores anteriormente mencionados pueden ser usados por si solos o en mezclas de los mismos.

Los gases propulsores particularmente adecuados son derivados de alcano halogenados seleccionados de entre TG 11, TG 12, TG 134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados anteriormente mencionados, TG134a (1,1,1,2-

000030

tetrafluoroetano) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y mezclas de los mismos son particularmente adecuados.

Los aerosoles inhalables que contienen gas propulsor pueden también contener otros ingredientes tal como cosolventes, estabilizadores, agentes de superficie activa (surfactantes), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes son conocidos en el estado de la técnica.

Los aerosoles inhalables que contienen gas propulsor de acuerdo con la invención pueden contener hasta 5% en peso de sustancia activa. Los aerosoles de acuerdo con la invención contienen, por ejemplo, 0.002 a 5% en peso, 0.01 a 3% en peso, 0.015 a 2% en peso, 0.1 a 2% en peso, 0.5 a 2% en peso o 0.5 a 1% en peso de ingrediente activo.

Alternativamente, las administraciones tópicas al pulmón pueden también ser por administración de una solución líquida o formulación de suspensión, por ejemplo empleando un dispositivo tal como un nebulizador, por ejemplo, un nebulizador conectado a un compresor (por ejemplo, el nebulizador Pari LC-Jet Plus(R) conectado a un compresor Pari Master(R) fabricado por Pari Respiratory Equipmen, Inc., Richmond, VA).

El anticuerpo de la invención puede ser entregado disperso en un solvente, por ejemplo en la forma de una solución o una suspensión. Este puede estar suspendido en una solución fisiológica apropiada, por ejemplo salina u otro solvente farmacológicamente aceptable o una solución reguladora. Las soluciones reguladoras conocidas en el arte pueden contener 0.05 mg a 0.15 mg de edetato disódico, 8.0 mg a 9.0 mg NaCl, 0.15 mg a 0.25 mg de polisorbato, 0.25 mg a 0.30 mg de ácido cítrico anhidro, y 0.45 mg a 0.55 mg de citrato de sodio por 1 ml de agua a fin de alcanzar un pH de alrededor de 4,0 a 5,0. Una suspensión puede emplear, por ejemplo, anticuerpo liofilizado.

Las suspensiones terapéuticas o formulaciones de solución pueden también contener uno o más excipientes. Los excipientes son bien conocidos en el arte e incluyen reguladores (por ejemplo, regulador de citrato, regulador de fosfato, regulador de acetato y regulador de bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol, y glicerol. Las soluciones o suspensiones pueden ser encapsuladas en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación generación se suministrará en una forma sustancialmente estéril que emplea procesos de fabricación estériles.

Esto puede incluir la producción y esterilización por filtración del solvente/solución regulado usado para la formulación, suspensión aséptica del anticuerpo en la solución solvente regulada estéril, y dispensación de la formulación en receptáculos estériles por medio de métodos familiares para los expertos en la materia.

La formulación de nebulización de acuerdo con la presente divulgación se puede suministrar, por ejemplo, como unidades de dosis simple (por ejemplo, recipientes o frascos plásticos sellados) empacados en sobres doblados. Cada frasco contiene una dosis unitaria en un volumen, por ejemplo 2 mL, del solvente/solución regulador.

Los anticuerpos acá divulgados pueden ser adecuados para entrega por medio de nebulización.

000031

También se prevé que los anticuerpos de la presente invención pueden ser administrados por el uso de terapia génica. Para lograr esto, las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de anticuerpo bajo el control de los componentes del ADN correspondiente se introducen en un paciente de tal manera que las cadenas de los anticuerpos se expresan a partir de las secuencias de ADN y son ensambladas *in situ*.

La presente invención también suministra una molécula de anticuerpo (o composiciones que comprenden los mismos" para su uso en el control de enfermedades inflamatorias. Adecuadamente, la molécula de anticuerpo (o composiciones que la comprenden) puede ser usada para reducir el proceso inflamatorio o para prevenir el proceso inflamatorio. En una modalidad, se suministra una reducción *in vivo* de células T activadas, en particular las involucradas en las respuestas inmunes inflamatorias inapropiadas, por ejemplo restablecimiento a la vecindad/ubicación de dicha respuesta.

La reducción de las células T activadas, como se emplea acá, puede ser una reducción, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o más por ciento en comparación con antes del tratamiento o sin tratamiento. Ventajosamente, el tratamiento con un anticuerpo, fragmento o composición de acuerdo con la presente invención, puede permitir la reducción en el nivel de las células T activadas, son reducir el nivel de células T general en los pacientes (células T inactivas). Esto puede resultar en menos efectos secundarios, y posiblemente en prevención de agotamiento de las células T en el paciente.

La presente invención también suministra la molécula de anticuerpo de la presente invención para su uso en el tratamiento o profilaxis de un desorden patológico que es mediado por OX40 o asociado con un nivel aumentado de OX40. La condición patológica puede, por ejemplo, seleccionarse del grupo que consiste de infecciones (viral, bacteria, hongo o parásitos), shock endotóxico asociado con la infección, artritis, artritis reumatoide, asma, EPOC, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad pilonidal, peritonitis, psoriasis, vasculitis, adherencias quirúrgicas, accidentes cerebrovasculares, diabetes tipo I, enfermedad de Lyme, artritis, meningoencefalitis, uveítis autoinmunes, trastornos mediados inflamatoria del sistema nervioso central y periférico, como esclerosis múltiple, lupus (tal como lupus eritematoso sistémico) y síndrome de Guillain-Barr, atópica dermatitis, hepatitis autoinmune, alveolitis fibrosante, enfermedad de Graves, nefropatía por IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad, pénfigo de Meniere, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, otros trastornos autoinmunes, pancreatitis, trauma (cirugía), injerto contra huésped enfermedad, el rechazo de trasplantes, enfermedades del corazón tal como enfermedades isquémicas como infarto de miocardio, así como aterosclerosis, coagulación intravascular, resorción ósea, osteoporosis, osteoartritis, periodontitis e hipocloridia.

En una modalidad, el anticuerpo de acuerdo con la invención es empleado en el tratamiento de alergia, COPD, enfermedad autoinmune o artritis reumatoide.

000032

La presente invención también suministra una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento o profilaxis de dolor, particularmente dolor asociado con inflamación.

La presente invención además suministra el uso de una molécula de anticuerpo, fragmento o composición de acuerdo con la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de un desorden patológico que es mediado por OX40 o asociado con un nivel aumentado de OX40, en particular el desorden patológico es artritis reumatoide, asma o COPD.

La presente invención además suministra el uso de una molécula de anticuerpo, fragmento o composición de acuerdo con la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una o más indicaciones médicas descritas acá.

Una molécula de anticuerpo, fragmento o composición de la presente invención puede ser utilizada en cualquier terapia donde se desee reducir los efectos de OX40 en el cuerpo humano o animal. El OX40 puede estar circulando en el cuerpo o puede estar presente en un nivel indeseadamente alto localizado en un sitio particular en el cuerpo, por ejemplo un sitio de inflamación.

En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente invención o una composición que comprende la misma es usada para el control de una enfermedad inflamatoria, por ejemplo como se describe acá.

La presente invención también suministra un método para tratar sujetos humanos o animales que sufren de o están en riesgo de un desorden mediado por OX40, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la molécula de anticuerpo de la presente invención o una composición que comprende la misma.

En una modalidad, se suministra un proceso para purificar un anticuerpo (en particular un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención) que comprende los pasos:

llevar a cabo la cromatografía de intercambio de aniones en modo de no unión de modo que las impurezas son retenidas en la columna y el anticuerpo es eludido.

Las resinas adecuadas de intercambio de iones para su uso en el proceso incluyen resina Q.FF (suministrada por GE-Healthcare). El paso puede, por ejemplo, ser llevado a cabo a un pH de aproximadamente 8.

El proceso puede además comprender un pase de captura inicial que emplea la cromatografía de intercambio de cationes, llevada a cabo por ejemplo a un pH de aproximadamente 4 a 5, tal como 4.5. La cromatografía de intercambio de cationes puede, por ejemplo emplear una resina tal como resina CaptoS o SP sefarosa FF (suministrada por GE-Healthcare). El anticuerpo o fragmento puede luego ser eludido a partir de la resina empleando una solución de sal iónica tal como cloruro de sodio, por ejemplo a una concentración de 200mM.

Así, el paso o pasos de cromatografía puede incluir uno o más pasos de lavado, como se apropiado.

El proceso de purificación puede también comprender uno o más pasos de filtración, tal como un paso de filtración.

Un pI por encima de 8, tal como 8.5, 8.6, 8.7, 8.8 o 9.0 del anticuerpo o fragmento se cree que asiste en la purificación para suministrar el anticuerpo o

000033

fragmento “libre” o “sustancialmente libre” de impurezas, tales como endotoxinas, ADN y proteínas de células huésped.

Por lo tanto, en una modalidad, se suministra un anticuerpo o fragmento de OX40 purificado, por ejemplo un anticuerpo o fragmento humanizado, en particular un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención, en forma sustancialmente purificada, en particular libre o sustancialmente libre de endotoxinas o proteína de célula huésped o ADN.

La forma purificada como se usa *supra* se refiere a por lo menos 90% de pureza, tal como 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% w/w o más puro.

Sustancialmente libre de endotoxina generalmente se refiere a un contenido de endotoxina de de 1EU por mg de producto anticuerpo o menos, tal como 0.5 o 0.1 EU por mg de producto.

Sustancialmente libre de proteína de célula huésped o ADN generalmente se refiere a un contenido de proteína de célula huésped o ADN de 400µg por mg de producto anticuerpo o menos, tal como 100µg por mg o menos, en particular 20µg por mg, como sea apropiado.

La molécula de anticuerpo de la presente invención puede también ser usada en diagnóstico, por ejemplo en el diagnóstico *in vivo* e imagen de estados de enfermedad que involucran OX40.

Comprendido en el contexto de la presente descripción significa que lo incluye.

Donde sea técnicamente apropiado, las modalidades de la invención pueden ser combinadas.

Las modalidades acá se describen como que comprenden ciertas características/elementos. La divulgación también se extiende a modalidades separadas que consisten o que esencialmente consisten de dichas características/elementos.

La presente invención es descrita adicionalmente por medio de ilustración únicamente en los siguientes ejemplos, los cuales se refieren a las Figuras adjuntas, en las cuales:

EJEMPLOS

Figura 1 en detalle:

- a) Región V de cadena ligera de anticuerpo A26 (SEQ ID NO:7)
- b) Región V de cadena pesada de anticuerpo A26 (SEQ ID NO:9)
- c) CDRH1 (SEQ ID NO:1), CDRH2 (SEQ ID NO:2), CDRH3 (SEQ ID NO:3), CDRL1 (SEQ ID NO:4), CDRL2 (SEQ ID NO:5), CDRL3 (SEQ ID NO:6) de anticuerpo A26) y CDRH2 (SEQ ID NO:20) y CDRL1 (SEQ ID NO:21) de anticuerpo CA044_00026.
- d) Cadena ligera de anticuerpo A26 (SEQ ID NO:11)
- e) Cadena ligera de anticuerpo A26 que incluye secuencia de señal (delineada) (SEQ ID NO:12)
- f) Cadena pesada de anticuerpo A26 (SEQ ID NO:15)
- g) Cadena pesada de anticuerpo A26 que incluye secuencia de señal (delineada) (SEQ ID NO:16)
- h) Región variable de cadena ligera que codifica ADN del anticuerpo A26 (SEQ ID NO:8)
- i) Región variable de cadena pesada que codifica ADN del anticuerpo A26 (SEQ ID NO:10)

000034

- j) Cadena ligera que codifica ADN del anticuerpo A26 (SEQ ID NO:13)
- k) Cadena ligera que codifica ADN del anticuerpo A26 que incluye secuencia de señal (SEQ ID NO:14)
- l) Cadena pesada que codifica ADN del anticuerpo A26 (SEQ ID NO:17)
- m) Cadena pesada que codifica ADN del anticuerpo A26 que incluye secuencia de señal (SEQ ID NO:18)
- n) Cadena pesada y cadena ligera que codifica ADN del anticuerpo A26 que incluye secuencias de señal y secuencia intergénica IGS2 (SEQ ID NO:19)

Manipulaciones de ADN y métodos generales

Se utilizó la cepa *E. coli* INV α F' (Invitrogen) para la transformación y el crecimiento de cultivo de rutina. La restricción de ADN y enzimas de modificación fueron obtenidas de Roche Diagnostics Ltd. y New England Biolabs. Las preparaciones de plásmidos se realizaron utilizando los kits de purificación de plásmido Maxi (QIAGEN, No. de catálogo 12165). Las reacciones de secuenciación del ADN se realizaron con el ABI Prism Big Dye terminator kit de secuenciación (No. de catálogo 4304149) y se ejecuta en un secuenciador ABI 3100 automatizado (Applied Biosystems). Los datos fueron analizados utilizando el programa AutoAssembler (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos fueron obtenidos de Invitrogen. Los genes que codifican la región V inicial-secuencias fueron diseñados y construidos por un planteamiento de síntesis automatizada por Entelechon GmbH, y modificado para generar las versiones injertadas por mutagénesis dirigida de oligonucleótidos. La concentración de Fab' se determinó usando ensamble Fab' ELISA.

Ejemplo 1: Producción y humanización de un anticuerpo A26 de OX40 humanizado

Las ratas hembra Sprague Dawley fueron inmunizadas con proteína de fusión recombinante de OX40 humano y mFC. El anticuerpo CA044_00026 el cual se une a OX40 humano fue aislado usando los métodos descritos en WO92/02551. Los genes para el dominio variable de cadena pesada (VH) y el dominio variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo CA044_00026 fueron aislados y secuenciados después de la clonación por medio de PCR de transcripción inversa.

Una serie de regiones VL y VH humanizadas fueron diseñadas usando estructuras aceptadoras de región V humana y por medio de la variación del número de residuos donantes en las regiones de estructura. Dos regiones VH injertadas (gH1 y 2) y 8 regiones VL injertadas (gL1 a 8) fueron diseñadas y los genes fueron construidos por medio de ensamble de oligonucleótidos y mutagénesis PCR.

Los fragmentos Fab' de anticuerpo fueron construidos para cada injerto usando los genes que codifican los dominios variables humanizados los cuales fueron sub-clonados en vector de expresión pTTOD *E.coli*, el cual contiene ADN que codifica el dominio CH1 de cadena pesada Cy1 (alotipo G1m17) y el dominio constante de cadena ligera kappa C humano (alotipo K1m3) (como se definió anteriormente en WO03/048208). La región de bisagra es truncada y modificada, que consiste del cambio de secuencia de Cys-Pro-Pro-Cys a Cys-Ala-Ala para generar una región de bisagra con un residuo de cisteína simple disponible para unión específica de sitio de una porción de PEG (ver Ejemplo 2).

Las secuencias que codifican el péptido de señal OmpA fueron unidas al extremo 5' de los genes que codifican las cadenas pesada y ligera. En expresión, las secuencias de señal eligen como objetivo el transporte de cada polipéptido al periplasma de bacteria. Después del desplazamiento a través de la membrana celular, la secuencia de señal es cortada, dejando las cadenas pesada y ligera de Fab' maduro.

El vector pTTOD que contiene cada injerto fue transformado en la cepa huésped *E. coli* K12 W3110 y los fragmentos Fab' de anticuerpos producidos en *E. coli* por el cultivo de alta densidad celular usando métodos estándar. Los anticuerpos fueron purificados mediante intercambio de cationes seguido por cromatografía de intercambio aniónico con los métodos estándar (Humphreys y otros, 2002, Expresión y Purificación de Proteínas, 26, 309 a 320).

Los varios fragmentos Fab' producidos fueron probados en la unión y el bloqueo aquí descritos y cada uno se evaluó en términos de su expresión en *E. coli*, su potencia en relación con el anticuerpo de origen, y su idoneidad para la purificación y procesamiento posterior. Esto condujo a la selección de gL8gH2 injerto que se llamaba A26. Las secuencias de la región V de este injerto se muestran en la Figura 1 (a) y (b) y en la SEQ ID NO:7 y 9 para la cadena ligera (GL2) y cadenas pesadas (GH2), respectivamente.

La estructura aceptadora de cadena pesada es la secuencia de línea germinal humana VH3 1-3 3-07 con la estructura 4 que viene de este punto de la línea germinal JH4 de la región JH. Los aminoácidos en las posiciones 37, 73, 78 y 94 (numeración de Kabat) en la cadena pesada de la SEQ ID NO:9 son residuos donantes (del anticuerpo padre) los cuales se encontró que son esenciales para la retención de potencia completa. El residuo 64 dentro de CDRH2 fue convertido del glutamato donante a la lisina receptora (E64K) para crear una molécula con un pI mayor, más favorable para la purificación de intercambio de iones. Los aminoácidos en las posiciones 64 y 71 (numeración de Kabat) en la cadena ligera de la SEQ ID NO:7 son residuos donantes que son esenciales para la retención de potencia completa. Los residuos 27 y 28 dentro de CDR-L1 fueron convertidos de glutamato y aspartato donante a la glutamina receptora (E27Q) y serina (D28S) para crear una molécula con un pI mayor, más favorable para la purificación de intercambio de iones.

Los CDR de este anticuerpo se muestran en la Figura 1(c) como que son el CDRH2 (SEQ ID NO:20) y CDRL1 (SEQ ID NO:21) originales los cuales no son modificados. Las cadenas ligera y pesada de longitud completa se muestran en las Figuras 1(d) y (f) respectivamente.

Los genes gL8 y gH2 fueron rediseñados en el nivel de ADN que contiene codones para las regiones variable y constante optimizadas para la expresión en *E. coli* y expresadas en el vector pTTOD(Fab') como se describió anteriormente. Las secuencias de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada se muestran en las Figuras 1(k), SEQ ID NO:14 y (m) SEQ ID NO:18, respectivamente.

La secuencia de proteína de este Fab' (incluyendo las regiones constantes) se suministran en las SEQ ID NOS:1 y 12 (cadena ligera sin y con péptido de señal OmpA) y las SEQ ID NOS:15 y 16 (cadena pesada sin y con péptido de señal OmpA). El vector de expresión dicistrónico pTTOD (A26 IGS2) incluye la secuencia suministrada en la Figura 1 (n) y la SEQ ID NO:19. La secuencia contiene una secuencia intergénica, IGS2, entre los genes de cadena ligera y

pesada (ver WO03/048208) y la secuencia líder OmpA al comienzo de los genes de cadena ligera y pesada.

Ejemplo 2: Producción de A26Fab'-PEG

El fragmento Fab' A26 producido en *E. coli* y purificado como se describió en el Ejemplo 1 fue PEGilado de acuerdo con los métodos descritos en WO207/003898.

El PEG se unió a la cisteína de bisagra en la posición 226 (numeración lienal) de la cadena pesada (SEQ ID NO:15) de modo que un grupo lisil-maleimida fue unido al residuo de cisteína en la posición 226 de la cadena pesada (SEQ ID NO:15), y cada grupo amino del residuo de lisil se ha ligado covalentemente a un residuo metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20000 Da. El peso molecular total del PEG unido al anticuerpo fue por lo tanto aproximadamente 40000Da, como se muestra en la Figura 2.

Ejemplo 3: Valoración de la afinidad de A26 y A26Fab'-PEG por OX40

La tecnología BIAcore monitorea la unión entre las biomoléculas en tiempo real y sin el requerimiento de etiquetado. Uno de los interactuantes, denominado el ligando, es inmovilizado directamente o capturado en la superficie inmovilizada mientras que el otro, denominado el analito, fluye en la solución por la superficie capturada. El sensor detecta el cambio en masa en la superficie del sensor a medida que el analito se une al ligando para formar un complejo en la superficie. Esto corresponde al proceso de asociación. La disociación del analito a partir del ligando es monitoreada cuando el analito se reemplaza por búfer. En el ensayo BIAcore de afinidad, el ligando es el anticuerpo que es probado y el analito es el OX40 humano.

Instrumento: Biacore ® 3000, Biacore AB, Uppsala, Suecia

Chip sensor: CM5 (grado investigación) Número de Catálogo: BR-1001-14, Biacore, AB, Uppsala, Suecia. Los chips fueron almacenados a 4 °C.

Kit de Acoplamiento de Amina: Número de Catálogo: BR-1000-50, Biacore AB, Uppsala, Suecia. Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidroclicida (EDC). Hecho hasta 75 mg/mL en agua destilada y almacenada en 200 µL alícuotas a -70 °C.

N-Hidroxisuccinimida (NHS). Hecha hasta 11.5 mg/mL en agua destilada y almacenada en 200 µL alícuotas a -70 °C.

1 M hidroclicuro de Etanolamina NaOH pH 8.5. Almacenada en 200 µL alícuotas a -70 °C.

Búferes: Búfer de ejecución: HBS-EP (que es 0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% de Surfactante P20). Número de Catálogo: BR-100188, Biacore AB, Uppsala, Suecia. Búfer almacenado a 4 °C.

Búfer de inmovilización: Acetato 5.0 (que es 10 mM acetato de sodio pH 5.0). Número de catálogo: BR-1003-51, Biacore AB, Uppsala, Suecia. Búfer almacenado a 4 °C.

Captura de ligando: Fragmento F(ab')₂ afinipuro anti-humano de cabra IgG, fragmento específico F(ab')₂. Jackson ImmunoResearch Inc (Pensilvania, EE.UU.) Número de catálogo: 109-006-097. Reagente almacenado a 4 °C.

Ligando: Anticuerpos A26 y A26Fab'-PEG, almacenados a 4°C.

Analito: Dominio extracelular (185 aa) OX40 humano fusionado al IgG2a Fc (232 aa) murino. (0.5mg/ml, Ancell No. 513-020 lote 142805), almacenada a 4°C.

000037

Solución de Regeneración: 40 mM de HCl preparado por dilución con agua destilada de una solución de 11.6 M (BDH, Poole, Inglaterra. Número de catálogo: 101254H).

5 mM de NaOH preparados por dilución con agua destilada de una solución de 20 mM. Número de catálogo: BR-1003-58, Biacore AB, Uppsala, Suecia.

Método de Ensayo: El formato de ensayo fue captura del anticuerpo por medio del F(ab')₂ inmovilizado luego valoración del OX40 de dominio extracelular humano en la superficie capturada. Un ejemplo del procedimiento se muestra a continuación:

BIA (Análisis de Interacción Biomolecular) fue llevado a cabo usando un BIAcore 3000 (BIAcore AB). El Fragmento F(ab')₂ afinipuro anti-humano de cabra IgG, fragmento específico F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch) fue inmovilizado en un Chip Sensor CM5 por medio de química de acoplamiento de amina a un nivel de captura de ≈ 4000 unidades de respuesta (RU). El búfer HBS-EP (10mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% de Surfactante P20, BIAcore AB) fue utilizado como el búfer de ejecución con una tasa de flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Una inyección de 10 μL de Fab' a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o Fab'-PEG a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue utilizada para su captura por medio del anti-humano IgG-F(ab')₂ inmovilizado. El OX40 humano fue valorado por el anticuerpo capturado en varias concentraciones (25nM a 0.78nM) a una tasa de flujo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. La superficie fue regenerada por una inyección de 10 μL de 40 mM de HCl, seguido por una inyección de 5 μL de 5 nM de NaOH a una tasa de flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Las curvas de unión de substracción de antecedentes fueron analizadas usando el software BIOevaluation (versión 3.2) siguiendo procedimientos estándar. Los parámetros cinéticos fueron determinados a partir de algoritmo de ajuste.

El valor de afinidad determinado para A26 se encontraba en el rango de 19 a 45.4pM y A26Fab'-PEG se encontraba en el rango de 13.7 a 50.3pM.

La siguiente tabla muestra los datos replicados para un fragmento Fab humanizado no PEGilado A26 (fab*) y fragmento Fab A26 Fab'-PEG (Fab-PEG**), OX40 humano de unión:

Tabla 1

Muestra	$k_a(1/\text{Ms})$	$K_d(1/\text{s})$	KD(M)	KD(pM)
Fab*	4.86 ± 1.6 E+05	1.29 ± 0.07 E-05	2.96E-11	29.6
Fab-PEG**	4.76 ± 2.1 E+05	1.30 ± 0.46 E-05	3.13E-11	31.3

*promedio de 5 determinaciones, **promedio de 4 determinaciones

Ejemplo 3a: Afinidad basada en célula y capacidad de bloqueo de ligando de A26Fab'-PEG

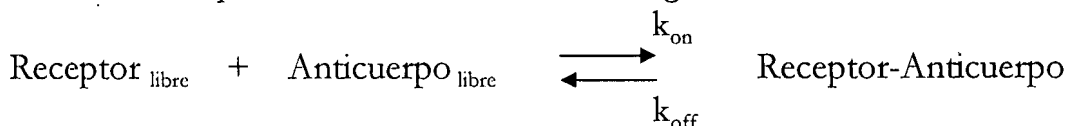
Afinidad basada en célula

Para determinar la afinidad de A26Fab'-PEG para la *superficie celular* de antígeno expresado, se llevaron a cabo experimentos de unión de saturación usando células CD4+OX40+ T activadas, y anticuerpo FITC etiquetado. La

000038

unión específica del anticuerpo al receptor *en equilibrio* a lo largo un rango de concentraciones de ligando, fue utilizada para determinar la K_D , asumiendo que sólo una muy pequeña fracción del anticuerpo fue unida al receptor en cualquier punto de la curva de unión.

La unión de equilibrio es descrita usando la siguiente ecuación:



Tasa de asociación de anticuerpo con receptor = $k_{\text{on}} \times [\text{Receptor}_{\text{libre}}] \times [\text{Anticuerpo}_{\text{libre}}]$

Tasa de disociación de complejo receptor-anticuerpo = $k_{\text{off}} \times [\text{Receptor-Anticuerpo}]$

En equilibrio, las tasas de asociación y disociación son iguales y una ecuación se puede derivar la cual describe el isotérmino de unión; en una trama de semi-log la unión es sigmoideal. El K_D se define por $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ y puede ser calculado a partir de la curva de unión a medida que la concentración en la cual la unión media máxima se presenta.

La unión del A26Fab'-PEG etiquetado FITC a las células de CD4+OX40+ humanas fue medida mediante ciometría de flujo a lo largo de un rango de concentración 4-log. Una curva de unión representativa para el A26Fab'-PEG se muestra en la Figura 3. Los valores de K_D obtenidos en las células activadas de 3 donantes diferentes fueron 1.193nM, 1.071nM y 1.055nM.

EL K_D basado en célula de A26Fab'-PEG (medio 1.106nM) es significativamente más débil que la unión del OX40 recombinante medido por BIAcore (31.3pM). Esto puede ser debido a un número de factores. El A26Fab'-PEG puede tener afinidad más alta para el OX40 recombinante expresado como una proteína de fusión FC dimérica, la cual tiene una estructura terciaria y cuaternaria diferente al OX40 expresado de superficie de célula nativa, predicho para asociarse como un trímero no covalente en la membrana celular (Chan y otros, 2000). Adicionalmente, la afinidad puede ser alterada por glicosilación diferencial de recombinante contra OX40 nativo. El ambiente de 3 dimensiones de la membrana celular tal como convoluciones de membrana y proteínas co-localizadas, pueden también suministrar impedimento estérico, limitando la accesibilidad del OX40 al A26Fab'-PEG. Consecuentemente, la afinidad basada en la célula probablemente representa una medición más cercana de la afinidad real del medicamento *in vivo*.

Métodos: Unión de A26Fab'-PEG a Células T CD4+OX40+ activadas humanas

El PBMC fue aislado por separación en un gradiente Ficoll y activado con 1µg/mL de PHA-L por días a 37°C, 5% de CO₂, 100% de humedad. Las células T CD4+ fueron aisladas mediante selección negativa usando partículas magnéticas (Kit de Aislamiento de células T CD4+ para Humanos; Miltenyi Biotec). Aproximadamente 1.2×10^5 células fueron incubadas en presencia del anticuerpo (rango de concentración final de 10µg/mL a 0.0006µg/mL (111nM a 0.0068nM)) por 2 horas en hielo. Las células fueron lavadas antes del análisis mediante ciometría de flujo usando un FACScalibur (Becton Dickinson). Dos curvas de valoración fueron producidas, una con A26Fab'-PEG y una segunda

000039

con gA33Fab'-PEG como un control de unión no específico. El análisis de regresión lineal fue usado para sustraer la unión no específica y la curva de unión específica generada fue analizada por medio de regresión no lineal (Graphpad Prism®) para determinar el K_D .

Ejemplo 3b: Capacidad de bloqueo de ligando

La capacidad del A26Fab'-PEG de bloquear la interacción entre el OX40 expresado de superficie de célula y el OX40L recombinante fue medida usando un ensayo de bloqueo de ligando con base en citometría de flujo. En pocas palabras, las células T CD4+OX40+ humanas fueron pre-incubadas con una valoración de A26Fab'-PEG. El OX40L recombinante fue subsecuentemente adicionado a las células y se permitió la unión en presencia de A26Fab'-PEG. La proporción de OX40L unido fue luego detectada mediante citometría de flujo usando un reagente secundario etiquetado. La Figura 4 muestra una curva representativa de inhibición y demuestra que el A26Fab'-PEG es capaz de bloquear completamente la unión de OX40L. El IC_{50} medio para la inhibición de la unión de OX40L recombinante fue de 4.1nM ($n = 2$ donantes).

Métodos: Inhibición de la unión de OX40L a Células T CD4+OX40+ activadas humanas por medio de A26Fab'-PEG

Los PBMC fueron aislados por separación en un gradiente Ficoll y activados con 1µg/mL PHA-L por 3 días a 37°C, 5% CO₂, 100% de humedad. 2.5×10^5 células fueron incubadas en la presencia de anticuerpos (rango final de concentración de 20µg/mL – 0.0003µg/mL (229 nM – 0.0035nM)) por 10 minutos sobre hielo. OX40L (CD252 muCD8 biotinilatado, Ancell) fue añadido en una concentración final de 2 µg/mL e incubados por otros 30 minutos sobre hielo. Las células fueron lavadas y el OX40L atado fue detectado por incubación con estreptavidina etiquetada PE (Jackson ImmunoResearch) antes del análisis por medio de citometría de flujo usando un FACScalibur (Becton Dickinson). gA33 Fab'-PEG fue usado como un control no específico. La curva de inhibición fue analizada por una regresión no lineal (Graphpad Prism®) para determinar el IC_{50} . Los datos mostrados vienen de uno o dos donadores representativos.

Ejemplo 4: Potencia de A26Fab'-PEG en ensayos funcionales humanos

Para evaluar su potencia en bloquear OX40-OX40L endógeno atado durante las interacciones celulares, el A26 Fab'-PEG fue probado en un rango de respuesta de células T antígenas realizadas en humanos.

Ejemplo 4a: Reacción de linfocitos mezclados

Desarrollado por primera vez en 1964 (Bach *y otros.*, 1964, Ciencia 143, 813-814) la reacción de linfocitos mezclados alogénicos (MLR) es un modelo *in vitro* de activación de célula T aloreactiva y proliferación (O'Flaherty *y otros.*, 2000, Inmunología, 100, 289-299), usando todas las células periféricas de sangre mononucleares (PBMC) de dos donadores no relacionados. Los donadores de células T son activados a través del reconocimiento de antígenos alogénicos de mejor complejo de histocompatibilidad (MHC) sobre un simulador de donadores no relacionados PBMC, resultando en una proliferación celular y producción de citoquinas (Lukacs *y otros.*, 1993, Am J Pathology, 143, 1179-1188). La alorreacción linfocita T ha mostrado que puede ser conducida por el antígeno MHC alogénico y el péptido atado (Sherman *y otros.*, 1993, Annu. Rev. Immunol, 11, 385-402), sugiriendo una respuesta MLR contra el estimulador alogénico de antígenos MHC y los péptidos atados. La magnitud de una respuesta MLR se

correlaciona con el grado de MHC no coincidentes entre el par de estimuladores de respuesta (Forrester *y otros.*, 2004, Trasplante Corneal: Una Guía Inmunológica al Problema Clínico, Imperial College Press, 66-67). Una respuesta MLR resulta en la proliferación de las células del donador de respuesta y la producción de TH1 (IL-2, IFN- γ y TNF- α) y TH2 (IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13) citocinas derivadas de las células T. El perfil exacto de citocinas en un MLR es ideal que sea específico al par de estimuladores de respuesta (Jordan *y otros.*, 2002, J. Immunol. Methods, 260, 1-14). Los ensayos MLR han sido utilizados ampliamente en la investigación para el estudio de las vías de activación de la célula T y drogas inmunosupresoras de monitoreo, y en situaciones clínicas para evaluar la función inmune en pacientes con síndromes de deficiencia de inmunidad (AIDS) y predecir los posibles rechazos de órganos donadores en los recipientes (Bromelow *y otros.*, 2001, J. Immunol. Methods, 247, 1-8).

El efecto de A26Fab'-PEG en la activación de células T alorreactivas *in vitro* en humanos y la proliferación se investigó usando un ensayo MLR como se describe por O'Flaherty *y otros.*, 2000. Los PBMC de dos donantes no relacionados fueron co-cultivadas en presencia y ausencia de A26Fab'-PEG y la proliferación celular medida por incorporación de 3H-timdina. Como se muestra en la figura 5, A26-PEG Fab' inhibe la proliferación de células T en función de la dosis con un valor de IC₅₀ de 2.149nM (0.1877 μ g/mL) y una inhibición máxima del 57%. Supernatantes de la MLR humana fueron analizados en un ensayo Meso Scale Discovery (MSD) de citoquinas humanas para investigar el efecto de la A26 Fab'-PEG en la producción de citoquinas. A26Fab'-PEG inhibe parcialmente la producción de IFN- γ (55% de inhibición), IL-13 (50% de inhibición) e IL-5 (80% de inhibición) en la MLR (datos no mostrados).

Método: Inhibición de la respuesta proliferativa de todo el PMBC MLR alogénico humano de una vía por A26Fab'-PEG.

Los PBMC humanos a partir de dos donantes no emparentados fueron aislados de toda la sangre. Las células de un donante se inactivaron por irradiación- γ para generar la población de estimulador. Las células del donante restantes formaron la población de respuesta. Las poblaciones de estimulador y de respuesta se mezclaron en una proporción de 1:1 (1x10⁵ células/donante) y se cultivaron en presencia de A26Fab'-PEG (1ng-100 μ g/mL) durante 6 días. A33 Fab'-PEG (reactivo local) se utiliza como reactivo de control. La proliferación celular se midió en el día 6 por la incorporación de 3H-timidina (0.5 μ Ci/pozo). Los datos se muestran como porcentaje de inhibición con respecto a la respuesta más la respuesta del estimulador en la ausencia de reactivos biológicos, y es la combinación de datos de 10 pares de donantes diferentes (media $\pm$ SEM). Los valores IC₅₀ fueron calculados utilizando el software GraphPad Prism®. Los resultados se muestran en la Figura 5.

Ejemplo 4b: Respuesta toxoide al tétano

El toxoide del tétano (TT) induce respuestas fuertes de inmunidad específica de las células T en individuos vacunados. *In vitro*, las respuestas a llamadas del antígeno específico al desafío TT pueden ser detectadas al monitorear la proliferación y la producción de citoquinas (TH1 & TH2) del PBMC (Bishop *y otros.*, 2005). La proliferación inhibida de A26Fab'-PEG y IL-5, IL-13, IFN- γ y la producción de TNF- α (datos no mostrados) en una forma dependiente de dosis, con una inhibición máxima de proliferación que alcanza el 38%. Los valores de

IC₅₀ para la inhibición de proliferación, calculada para 2 donantes, fueron 0.58nM (0.051µg/mL) y 1.11nM (0.097µg/mL). La figura 6 muestra la curva de inhibición de proliferación de A26Fab'-PEG para 1 donante.

Método: A26Fab'-PEG inhibe la proliferación de PBMC expuesto a Toxoide de Tétano

Los PBMC fueron aislados por separación en un gradiente de Ficoll y expuestos a 1µg/mL de Toxoide de Tétano (Calbiochem) en la presencia de A26Fab'-PEG (rango de concentración de 5µg/mL a 0.001µg/mL) en un volumen final de 200µL por pozo en una placa de fondo redondo de 96 pozos. Después de 5 días de incubación a 37°C, 5% de CO₂, 100% de humedad, la proliferación celular fue medida por medio de incorporación de ³H himidina (0.5µCi/pozo) en células activamente divisorias. Los resultados de un donante representativo sencillo son presentados. Los valores de IC₅₀ fueron calculados usando el software Graphpad Prism®.

Ejemplo 4c: Respuesta a ácaros de polvo

Asma aguda grave puede ser desencadenada por antígenos inhalados, tales como ácaros del polvo doméstico (Tillie-Leblond *y otros*, 2005, *Alergia*, 60, (1), 23 a 29), incluyendo las especies del género *Dermatophagoides pteronyssinus*. Dichos alérgenos inducen la respuesta proliferativa de las células de sangre periférica y la producción de citoquinas T_H2 polarizadas, en pacientes atópicos (Ling *y otros*, 2004, *The Lancet*, 363, 608 a 615). Un ensayo *in vitro* se estableció para determinar el efecto de OX40 bloqueo en la producción de la IL-13 de citoquinas T_H2 en respuesta a antígenos. Los PBMC fueron tomados de personas atópicas con un alérgeno-IgE específico (RAST) puntuación entre 3 y 5 (escala de 0 a 6) y estimulados con *Dermatophagoides pteronyssinus* antígeno en presencia de A26Fab'-PEG o anticuerpo de control. A26Fab' PEG-IL-13 inhibe la producción de un máximo de 60% con un valor de IC₅₀ de 1.23nM (figura 7). Además, A26Fab'-PEG también potencialmente inhibió la producción de las citoquinas IL-4, IL-5 y el TNF-α, en este ensayo, mientras que mejora los niveles de la citoquina IL-10 reguladora (figura 8).

Método Figura 7: A26Fab'PEG inhibe la producción de IL-13 a partir de PBMC expuesto a extracto alérgico de *Dermatophagoides pteronyssinus*

Los PBMC fueron aislados de voluntarios alérgicos por la separación en un gradiente de Ficoll. Los PBMC purificados fueron expuestos a 25µg/mL extracto alérgico de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Greer) en presencia de la prueba de anticuerpos (10µg/mL rango de concentración de 0.0005µg/mL) en un volumen final de 200µL por pozo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Después de 6 días de incubación a 37°C, CO₂ al 5%, 100% de humedad, los sobrenadantes se cosecharon y se analizó la IL-13 por contenido ELISA (Biosource). El gráfico representa los datos agrupados de tres donantes (medio ± SEM). Los valores de IC₅₀ fueron calculados utilizando el software GraphPad Prism®.

Método Figura 8: A26Fab'-PEG modula la producción de citoquina a partir de PBMC expuesto a extracto alérgico de *Dermatophagoides pteronyssinus*

Los PBMC fueron aislados de voluntarios alérgicos por separación en un gradiente de Ficoll. Los PBMC purificados fueron expuestos a 25µg/mL de extracto alérgico de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Greer) en presencia de

10µg/mL A26Fab'-PEG (114nM) o control (TN3 Fab'-PEG) en un volumen final de 200µL por pozo en una placa de fondo redondo de 96 pozos. Después de 6 días de incubación a 37°C, CO₂ al 5%, 100% de humedad, los sobrenadantes se recogieron y analizaron el contenido de citoquinas usando ensayo de lugar múltiple (MSD). Los gráficos representan los datos agrupados de tres donantes (medio ± SEM).

Resumen

Los valores de IC₅₀ para A26Fab'-PEG en ensayos funcionales en humanos se resumen en la **Tabla 2**. La potencia de A26Fab'-PEG es similar en los tres ensayos y se correlaciona bien con la medición de la afinidad basada en células de 1.106nM. En estos ensayos, ya sea la proliferación celular y/o la producción de varias citoquinas inflamatorias, se suprimió de manera significativa, lo que demuestra que A26Fab'-PEGy profundamente inhibe la activación de células T. El toxoide tetánico y los ensayos de ácaros del polvo doméstico, ambos midieron las respuestas de llamado por células T de memoria, lo que significa que A26Fab'-PEG es capaz de inhibir las respuestas de células T establecidas a una variedad de antígenos.

Tabla 2. Valores medios de IC50 para A26Fab'-PEG en ensayos *in vitro* funcionales en humanos

Ensayo Funcional	IC ₅₀ Medio (nM)	IC ₅₀ Medio (µg/ml)
Reacción de Linfocito Mezclado -Inhibición de Proliferación (<i>n</i> = 10)	2.149	0.1877
Toxoide Tetánico - Inhibición de Proliferación (<i>n</i> = 2)	0.845	0.0733
Ácaros de Polvo Domésticos - Inhibición de producción de IL-13 (<i>n</i> = 3)	1.23	0.1067

La respuesta de la memoria atópica TH2 a antígenos de los ácaros del polvo proporciona un relevante ensayo *in vitro* para el asma alérgica y los datos sugieren que A26Fab'-PEG puede ser una terapia eficaz en esta indicación. OX40 co-estimulación ha sido vinculado a la inflamación de los pulmones, donde se sugiere que desempeñan un papel fundamental tanto en la diferenciación de alergenos específicos de ingenuo células T CD4 + en células inflamatorias T_H2 y las respuestas de la retirada de las células de memoria T_H2 (Wang y Liu, 2007, J. Clin. Invest, 117 (12), 3655 a 3657). Durante la inflamación alérgica, las citoquinas innatas del timo lifopoietina estromal (TSLP) producido por las células epiteliales hincapié en la maduración de las unidades de células dendríticas humanas e induce la expresión de OX40L. El OX40L funciona para promover la polarización T_H2 de las células T CD4+ con un fenotipo inflamatorio TNF-α mayor, pero sin producción de IL-10 (Ito y otros, 2005, J. Exp. Med, 202 (9), 1213 a 1223). En la respuesta de HBM, el A26Fab'-PEG inhibió potencialmente las citoquinas T_H2 IL-13, IL-5 y IL-4 así como TNF-α. Adicionalmente, en dos de

cuatro donantes alérgicos el A26Fab'-PEG mejoró la producción de IL-10. Por lo tanto, el A26Fab'-PEG puede tener la capacidad no sólo de inhibir las respuestas alérgicas sino también de modularlas hacia un fenotipo regulador.

Ejemplo 5: A26Fab'-PEG inhibe la proliferación de células T CD4+ y CD8+ en un modelo Hu-SCID

El modelo Hu-SCID incluye la reconstitución de ratones SCID con PBMC humanos que a su vez provocan una fuerte respuesta xenogénica contra el ratón anfitrión. Esta respuesta es seguida por la proliferación de las células T humanas en el ratón. Utilizando los datos determinados experimentalmente sobre la farmacocinética de A26Fab'-PEG se diseñó un régimen de dosificación que se tradujo en constante estado de plasma concentraciones de 8, 23 y 34µg/ml de A26Fab'-PEG. Los datos de la Figura 9 demuestra que las células T CD4+ y CD8+ son profundamente inhibidas por el mantenimiento de los niveles plasmáticos del estado de A26Fab'-PEG a 8, 23 y 34µg/ml.

Método: A26Fab'-PEG inhibe la proliferación de células T CD4+ y CD8+ en un modelo Hu-SCID.

Los ratones recibieron una dosis de carga de 0,825 mg, 2,475 o 8,25 mg / kg el día -2 y dosis de mantenimiento diaria subcutánea de 0,25, 0,75 o 2,5 mg / kg, respectivamente. Los ratones se han agotado las células NK en la dosificación con TMβ1 un día antes de la transferencia de ocho millones de PBMC humanos en la cavidad peritoneal en el día 0. El experimento luego finaliza en el día 14 y la sangre, líquido peritoneal lavado y homogeneizado de bazo se analiza para CD4+ y CD8+. Día 14 ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y sangrado por punción cardíaca. El número de CD4+ y CD8+ se determinó por análisis FACS. Datos (n = 10) se expresan como medios ± SEM. La disminución de células CD4+ y CD8+ en la sangre tras la administración de A26Fab'-PEG se muestra en la Figura 9.

Ejemplo 6: Reactividad cruzada de A26Fab'-PEG con OX40 de primate no humano

Para validar el uso de A26Fab'-PEG en modelos de enfermedad de primates no humanos (NHP) y toxicología clínica, su afinidad y potencia funcional relativas fueron comparadas en células humanas y NHP.

Afinidad con Base Celular en Células NHP

Las células T CD4+ Cynomolgus o rhesus fueron aisladas de sangre periférica y activa para expresar altos niveles de OX40. La afinidad de A26Fab'-PEG se determinó mediante análisis de regresión no lineal de las curvas de equilibrio de unión, como se muestra en la Figura 3. El A26Fab'-PEG mostró una caída de menos de 2 veces en la afinidad de las células T CD4+ cynomolgus o rhesus en comparación con los humanos, lo que indica que es de alta reactividad cruzada (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de afinidad con base celular de A26Fab'-PEG en células humanas y NHP.

A26 Fab'-PEG	K _D (nM)
Humano (n = 3)	1.106
Cynomolgus (n = 3)	1.859
Rhesus (n = 1)	1.202

000044

Los PBMC de NHOP fueron aislados en un gradiente de linfocito (VH Bio), activado con 1µg/ml de PHA-L por 3 días a 37°C, 5% de CO₂, 100% de humedad y las células T CD4+ fueron aisladas por selección negativa usando partículas magnéticas (Kit II de Aislamiento de células T CD4+ para primates no humanos; MiltenyiBiotec). Las afinidades fueron medidas como se describe en el Ejemplo 3a (Figura 3).

Ejemplo 7: Estudio de eficacia en el modelo CIA de mono Cynomolgus
Razón fundamental para el estudio y diseño del estudio

Artritis de Cynomolgus inducida por colágeno es un modelo estándar que se utiliza para el perfil de potenciales fármacos contra la artritis antes de la experimentación con seres humanos. En nuestras manos, este modelo responde a los tratamientos dirigidos contra el TNFα e IL-6. Estos datos son consistentes con los hallazgos clínicos de RA con el equivalente humano anti-terapéutico.

La inducción de la artritis en macacos requiere dos pasos de la inmunización con colágeno II separados por un período de 3 semanas. Los síntomas de artritis (inflamación y dolor en una o más articulaciones) pueden manifestarse en cualquier momento después de la segunda inmunización, y fueron evaluados semanalmente con una puntuación de la artritis. El experimento se realizó durante 11 semanas en total. OX40 es una molécula de co-estimulación y por lo tanto interfiere con las funciones que se espera que tenga efectos en las fases de vacunación de la modelo. Tres regímenes de dosificación con Fab' A26-PEG fueron evaluados. Un grupo recibió A26Fab'-PEG (100mg/kg) una sola vez en el día antes de la primera inmunización. Un segundo grupo recibió Fab' A26-PEG (100mg/kg) una sola vez en el día antes de la vacunación segundo y el tercer grupo recibió Fab' A26-PEG (100mg/kg) un día antes de las vacunas primero y segundo. Un grupo control de animales recibieron un vehículo de tampón de acetato. El inicio de la enfermedad en el grupo tratado con el vehículo se caracteriza por elevaciones en suero de proteínas de fase aguda proteína C-reactiva (CRP) y haptoglobina, (marcadores biológicos que se miden en los ensayos clínicos RA). La integridad de la unión fue evaluada por rayos X y por examen histológico.

Resultados y conclusión

En animales tratados con A26Fab'-PEG en el días antes de la primera inmunización, la severidad de la artritis fue generalmente más baja que en grupo tratado con vehículo. Estas diferencias en los resultados de artritis fueron estadísticamente significantes en los días 49, 63 y 76. La figura 10 muestra un resumen total de los datos para los animales individuales expresados como área bajo la curva para resultados clínicos. La valoración con rayos X de erosión en el hueso a las articulaciones también fue reducida (Tabla 4) a medida que se presentaron cambios histopatológicos (Figura 11). Las concentraciones de PCR y haptoglobina tendieron a ser menores que en el grupo de control. Se obtuvieron resultados similares para el grupo de animales tratados con un A26Fab'-PEG días antes de la primera inmunización y un día antes de la segunda inmunización. Sin embargo, no hubo efecto convincente contra artríticas observado en animales que recibieron PEG-A26Fab' una sola vez en el día antes de la segunda inmunización. Estos datos muestran un efecto anti artrítica de tratamiento anti OX40 en CIA cynomolgus y demuestran la importancia del OX40 a la iniciación de la respuesta inmune patógena.

000345

Figura 10: Inhibición de resultados de artritis por A26Fab'-PEG en CIA cynomolgus. Los datos muestran el área animal individual bajo la curva (AUC) para los datos de resultados clínicos para los animales de control que reciben búfer de acetato antes de la primera y segunda inmunizaciones (Ac Ac), animales que reciben antes de la primera inmunización (A26 Ac), animales que reciben A26Fab'-PEG antes de la segunda inmunización (Ac A26) y animales que reciben A26Fab'-PEG antes de la primera y segunda inmunizaciones (A26 A26). Las barras son medianas.

Tabla 4. Efectos del tratamiento de A26Fab'-PEG en los resultados de rayos X de erosión en el hueso

Grupo	Día		
	0	35	76
Ac Ac	0	3.9 ± 1.7	24.8 ± 5.9
A26 Ac	0	0.3 ± 0.3	7.6 ± 3.9*
Ac A26	0	9.4 ± 4.5	17.9 ± 5.9
A26 A26	0	0.9 ± 0.7	5.3 ± 4.8**

Los animales Ac Ac recibieron vehículo búfer de acetato, los animales A26 Ac recibieron A26Fab'-PEG antes de la primera inmunización, los animales Ac A26 recibieron A26Fab'-PEG antes de la segunda inmunización y los animales A26 A26 recibieron A26Fab'PEG antes de la primera y segunda inmunizaciones. Las medianas ± s.e.m. *p<0.05, **p<0.01 prueba de Wilcoxin.

Método Figura 11: Reducción en el resultado histológico total en CIA cynomolgus por A26Fab'-PEG. Los datos muestran las puntuaciones totales histológicas (degeneración incorporación de cartílago y hueso, fibrosis, tejido de granulación e hiperplasia) de cada animal en la terminación del estudio. Animales Ac Ac recibieron vehículo de tampón acetato, animales A26 Ac recibido A26Fab'-PEG antes de la primera inmunización, los animales Ac A26 recibieron A26Fab'-PEG antes de la segunda inmunización y los animales A26 A26 recibieron A26Fab'-PEG antes de la primera y la segunda inmunizaciones. Las barras son las medianas. Por supuesto, se entenderá que la presente invención ha sido descrita a modo de ejemplo únicamente, de ninguna manera pretende ser limitante, y que las modificaciones de detalle se pueden hacer en el ámbito de las reivindicaciones adjuntas. Las características preferidas de cada modalidad de la invención son para cada una de las otras modalidades, *mutatis mutandis*. Todas las publicaciones, incluyendo pero sin limitarse a las patentes y solicitudes de patente, citadas en esta descripción se incorporan acá por referencia como si cada publicación fueran indicadas específica e individualmente para ser incorporadas por referencia en este documento como totalmente establecidas.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo antagonista el cual se une a OX40 humano que comprende una cadena pesada y una cadena liviana, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende al menos uno de un CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:1 para el CDR-H1, un CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:20 para el CDR-H2 y un CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:3 para el CDR-H3, y en donde el dominio variable de la cadena liviana comprende un CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:21 para el CDR-L1, un CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 5 para el CDR-L2 y un CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 6 para el CDR-L3.
2. Un anticuerpo antagonista de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cadena pesada comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:9.
3. Un anticuerpo antagonista de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cadena ligera comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:7.
4. Una molécula de anticuerpo antagonista de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la molécula de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de: una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesada y ligera de longitud completa o un fragmento de las mismas, tal como un Fab, Fab' modificado, Fab', F(ab')₂, Fv, VH, VL o fragmento de scFv.
5. Un anticuerpo antagonista el cual se une a OX40 humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:9 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:7.
6. Un anticuerpo antagonista el cual se une a OX40 humano, que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:15 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:11.
7. Una molécula de anticuerpo antagonista de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que tiene una molécula efectora o reportadora unida a la misma.
8. Una molécula de anticuerpo antagonista de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la molécula efectora comprende uno o más polímeros seleccionados del grupo que consiste de polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno de cadena ramificada o derechasustituida o un polisacárido no ramificado o ramificado, metoxipoli(etilenglicol) o poli(etilenglicol), o combinaciones de los mismos.
9. Una molécula de anticuerpo antagonista de acuerdo con la reivindicación 8, que tiene unido a uno de los residuos de cisteína en el extremo terminal C de la

000047

cadena pesada un grupo lisil-maleimida o lisil bis-maleimida en donde cada grupo amino del residuo lisil ha unido covalentemente a éste un residuo metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de 20000Da.

10. Una molécula de anticuerpo antagonista que tiene especificidad por OX40 humano, la cual es un fragmento Fab modificado que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:15 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:11 y que tiene unida a la cisteína en la posición 226 de la cadena pesada un grupo lisil-maleimida en donde cada grupo amino del residuo lisil ha unido covalentemente a éste un residuo metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20000Da.

11. Una secuencia de ADN aislado que codifica la cadena pesada dada en la SEQ ID NO: 10 y/o la cadena ligera dada en la SEQ ID NO: 8, de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12. Un vector plásmido de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el vector es el vector identificado como pTTOD.

13. Un vector de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el vector comprende las secuencias dadas en SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:18.

14. Un vector de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el vector comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:19.

15. Una célula huésped que comprende uno o más vectores de clonación o expresión de acuerdo con la reivindicación 12 o 13 o 14, en donde la célula huésped es E. coli K12 W3110.

16. Un proceso para la producción del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 15 y aislar el anticuerpo.

17. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en combinación con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

18. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17, que comprende adicionalmente otros ingredientes activos seleccionados del grupo que consiste de anti-TNF, anti-IL-1 α , anti-células T, anti-IFN γ , anti-LPS, anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4, xantenos, propionato de fluticasona, salbutamol, salmeterol, formoterol, rapamicina, ciclofosfamida y metotrexato.

19. Una proteína de fusión que enlaza OX40, que comprende una unidad de inmunoglobulina que une al OX40 y dos anticuerpos de dominio, en donde la

000048

unidad de inmunoglobulina que une el OX40 es el anticuerpo antagonista de la reivindicación 1.

20. La proteína de fusión de la reivindicación 19, en donde la unidad de inmunoglobulina es Fab o Fab'.

21. La proteína de fusión de la reivindicación 19 o 20, en donde los dos anticuerpos dominantes son una pareja de una variable pesada (VH) y variable ligera (VL), unidos por un enlace disulfuro.

22. La proteína de fusión de la reivindicación 21, en donde la pareja VH y VL enlaza la albúmina.

000049

RESUMEN

La presente invención se relaciona con moléculas de anticuerpo que tienen especificidad por determinantes antigénicos de humano OX40, usos terapéuticos de las moléculas de anticuerpo y métodos para producir dichas moléculas de anticuerpo.

000050

Figura 1

(a) Región variable de cadena ligera del anticuerpo A26 (SEQ ID NO:7)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSAS
GSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKR

(b) Región variable de cadena pesada del anticuerpo A26 (SEQ ID NO:9)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYRDSVK
GRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEIGFDYWGQGTLLTVSS

(c)
CDRH1: NYGIH (SEQ ID NO:1)
CDRH2: SISPSGGLTYRDSVKG (SEQ ID NO:2)
SISPSGGLTYRDSVEG (SEQ ID NO:20)
CDRH3: GGEIGFDY (SEQ ID NO:3)
CDRL1: RATQSIYNALA (SEQ ID NO:4)
RATEDIYNALA (SEQ ID NO:21)
CDRL2: NANTLHT (SEQ ID NO:5)
CDRL3: QQYYDYPLT (SEQ ID NO:6)

(d) Cadena ligera del anticuerpo A26 (SEQ ID NO:11)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSAS
GSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(e) Cadena ligera del anticuerpo A26 que incluye secuencia de señal (SEQ ID NO:12)
MKKTAIAI~~IA~~VALAGFATVAQADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAP
KLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 1 (continuación)

(f) Cadena pesada del anticuerpo A26 (SEQ ID NO:15)

000051

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYRDSVK
GRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCAA

(g) Cadena pesada del anticuerpo A26 que incluye secuencia de señal (SEQ ID NO:16)

MKKTAI AIAVALAGFATVAQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGK
LEWVASISPSGGLTYRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCAA

(h) Región variable de cadena ligera que codifica ADN del anticuerpo A26 (SEQ ID NO:8)

GATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTCTG
TGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCCTGA
TCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCT
ACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATTTGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCC
ACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAGATCAAACGT

000352

Figura 1 (Continuación)

(i) Región variable de cadena ligera que codifica ADN del anticuerpo A26 (SEQ ID NO:10)

GAGGTTTCAGCTGGTTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTG
TGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTCAGGCACCAGGTAAAG
GTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTACTACCGTGACTCTGTCAAA
GGTCGTTTTCACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCG
TGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTC
AGGGTACCCTGGTAACTGTCTCGAGC

(j) Cadena ligera que codifica ADN del anticuerpo A26 (SEQ ID NO:13)

GATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGGCATCGTGTGACTATTAC
CTGTCGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGC
CAAACTCCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTTCTCTGCGTCT
GGTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATTTGCGGACCTACTA
CTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAGATCAAACGTA
CGGTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACAGCTCAAATCTGGTACTGCT
TCTGTGCTTTGCCTCCTGAACAACCTTCTATCCGCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAGTTCGACAA
CGCACTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGACTCCAAAGACTCCACCTACT
CTCTGTCTAGCACCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTGTACGCTTTCGAA
GTTACCCATCAGGGTCTGTCTTCTCCGGTTACCAAAGCTTTAATAGAGGGGAGTGTTAA

(k) Cadena ligera que codifica ADN del anticuerpo A26 que incluye secuencia de señal (SEQ ID NO:14)

ATGAAAAAGACAGCTATCGCAATTGCAGTGGCCTTGGCTGGTTTTGCTACCGTAGCGCAAGCTGA
TATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGGCATCGTGTGACTATTACCT
GTCGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCA
AAACTCCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGG
TTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATTTGCGGACCTACTACT
GCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAGATCAAACGTACG
GTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACAGCTCAAATCTGGTACTGCTTC
TGTCGTTTGCCTCCTGAACAACCTTCTATCCGCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAGTTCGACAAAG
CACTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCT
CTGTCTAGCACCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTGTACGCTTTCGAAAGT
TACCCATCAGGGTCTGTCTTCTCCGGTTACCAAAGCTTTAATAGAGGGGAGTGTTAA

Figura 1 (Continuación)

(l) Cadena pesada que codifica ADN del anticuerpo A26 (SEQ ID NO:17)

000053

GAGGTTTCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTG
 TGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTCAGGCACCAGGTAAAG
 GTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTACTACCGTGACTCTGTCAA
 GGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCG
 TGCAGAAGATAACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTC
 AGGGTACCCTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACCAAAGGTCCGAGCGTTTTCCCACTGGCTCCG
 AGCTCTAAATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTGCCTGGTGAAAGACTACTTCCCAGA
 ACCAGTTACCGTGTCTTGGAACCTCTGGTGCCTGACCTCTGGTGTTCACACCTTTCCAGCAGTTC
 TGCAGTCTTCTGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGTTACCGTCCGTCTTCTTCTCTGGGTACT
 CAGACCTACATCTGCAACGTCAACCACAAACCGTCCAACACGAAAGTGGACAAAAAAGTCGAGCC
 GAAATCCTGTGACAAAACCCATACCTGCGCTGCGTAA

(m) Cadena pesada que codifica ADN del anticuerpo A26 que incluye secuencia de señal (SEQ ID NO:18)

ATGAAGAAGACTGCTATAGCAATTGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTCGCCACCGTGGCGCAAGCTGA
 GGTTTCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTG
 CAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTCAGGCACCAGGTAAAGGT
 CTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTACTACCGTGACTCTGTCAAAGG
 TCGTTTCACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTG
 CAGAAGATAACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAG
 GGTACCCTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACCAAAGGTCCGAGCGTTTTCCCACTGGCTCCGAG
 CTCTAAATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTGCCTGGTGAAAGACTACTTCCCAGAAC
 CAGTTACCGTGTCTTGGAACCTCTGGTGCCTGACCTCTGGTGTTCACACCTTTCCAGCAGTTCTG
 CAGTCTTCTGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGTTACCGTCCGTCTTCTTCTCTGGGTACTCA
 GACCTACATCTGCAACGTCAACCACAAACCGTCCAACACGAAAGTGGACAAAAAAGTCGAGCCGA
 AATCCTGTGACAAAACCCATACCTGCGCTGCGTAA

Figura 1 (Continuación)

(n) Cadena pesada y ligera que codifica ADN del anticuerpo A26 que incluye secuencia intergénica IGS2 (SEQ ID NO:19)

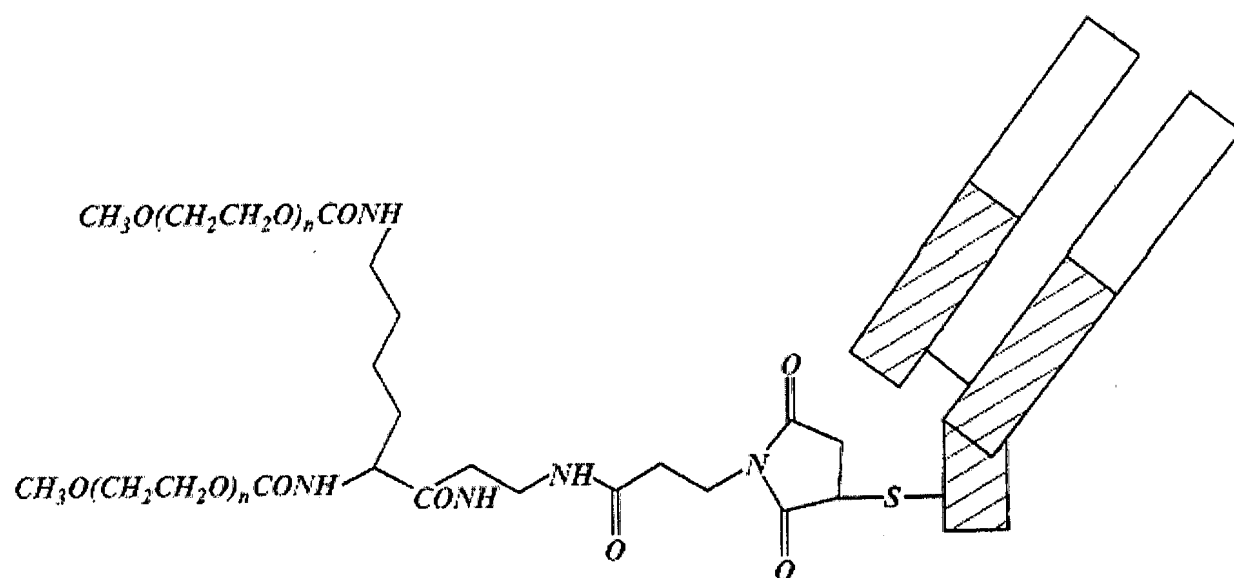
ATGAAAAAGACAGCTATCGCAATTGCAGTGGCCTTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAAGCTGA
 TATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCT
 GTCGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCA
 AAACTCCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGG

000054

TTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCTACTACT
GCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAGATCAAACGTACG
GTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACAGCTCAAATCTGGTACTGCTTC
TGTCGTTTGCCTCCTGAACAACTTCTATCCGCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAAGTCGACAACG
CACTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCT
CTGTCTAGCACCCCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTGTACGCTTGCGAAGT
TACCCATCAGGGTCTGTCTTCTCCGTTACCAAAGCTTTAATAGAGGGGAGTGTTAAAATGAAG
AAGACTGCTATAGCAATTGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTCGCCACCGTGGCGCAAGCTGAGGTTCA
GCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGCAA
GCGGTTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTCAGGCACCAGGTAAAGGTCTGGAA
TGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTACTACCGTGACTCTGTCAAAGGTCGTTT
CACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCAGAAG
ATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAGGGTACC
CTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACCAAAGGTCCGAGCGTTTTCCCACTGGCTCCGAGCTCTAA
ATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTGCCTGGTGAAAGACTACTTCCCAGAACCAGTTA
CCGTGTCTTGGA ACTCTGGTGC ACTGACCTCTGGTGTTCACACCTTTCAGCAGTTCTGCAGTCT
TCTGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGTTACCGTTCCGTCTTCTTCTCTGGGTACTCAGACCTA
CATCTGCAACGTCAACCACAAACCGTCCAACACGAAAGTGGACAAAAAAGTCGAGCCGAAATCCT
GTGACAAAACCCATACCTGCGCTGCGTAA

000055

Figura 2



000056

Figura 3

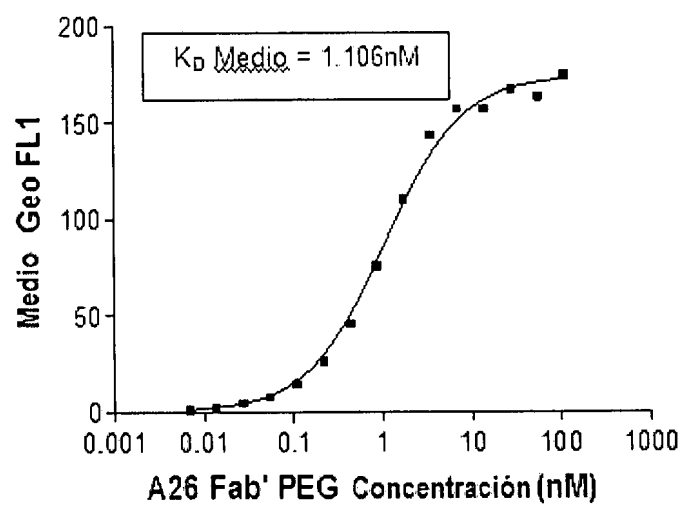


Figura 4

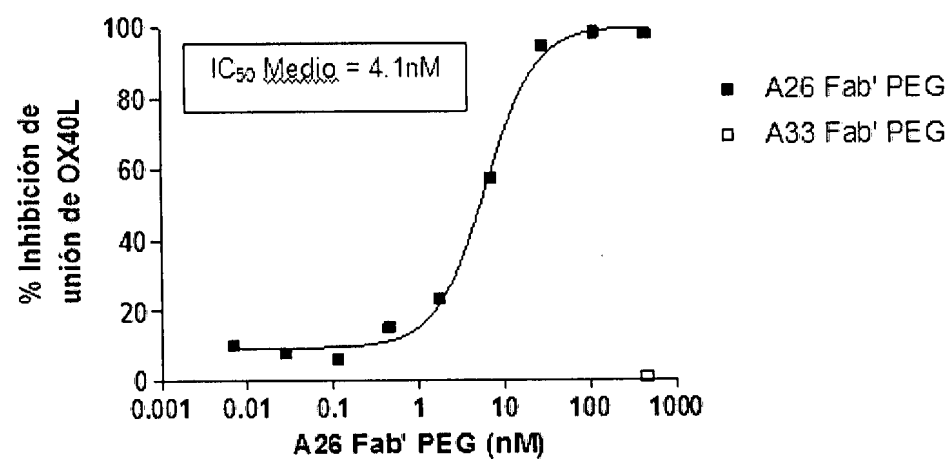


Figura 5

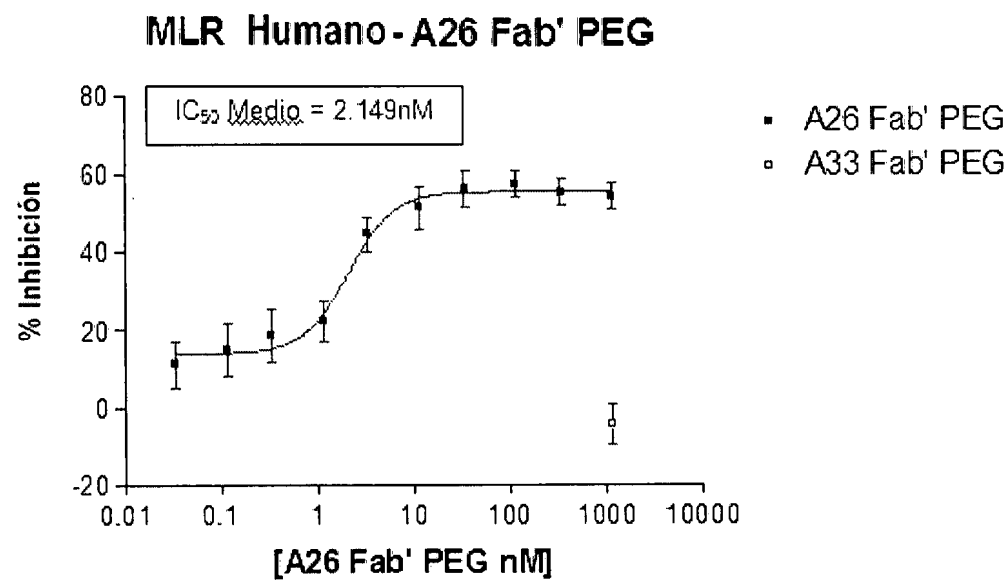


Figura 6

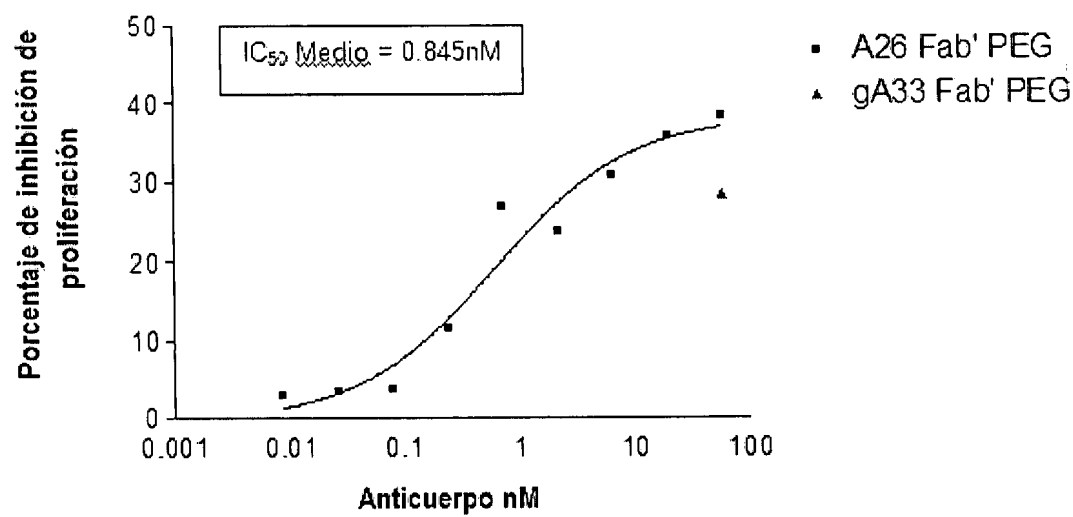


Figura 7

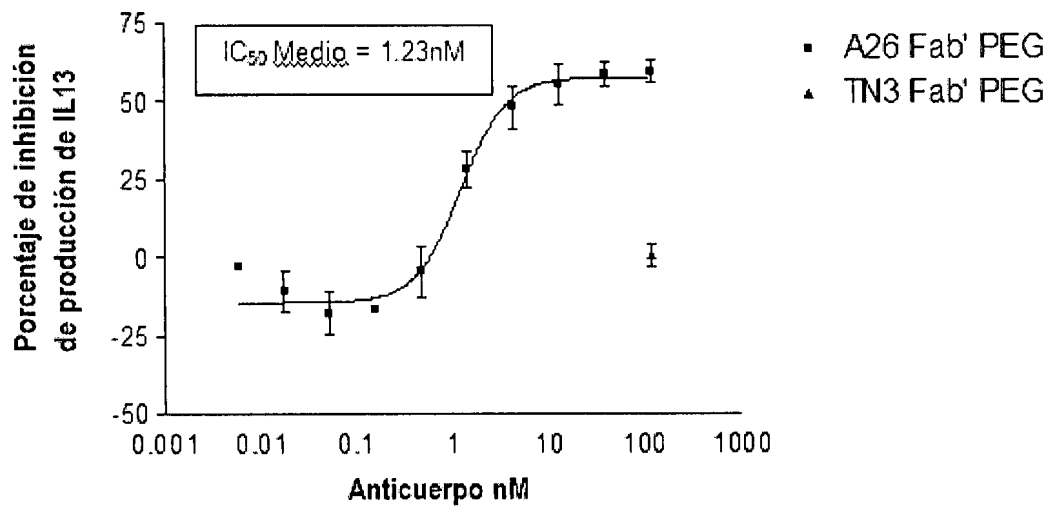


Figura 8

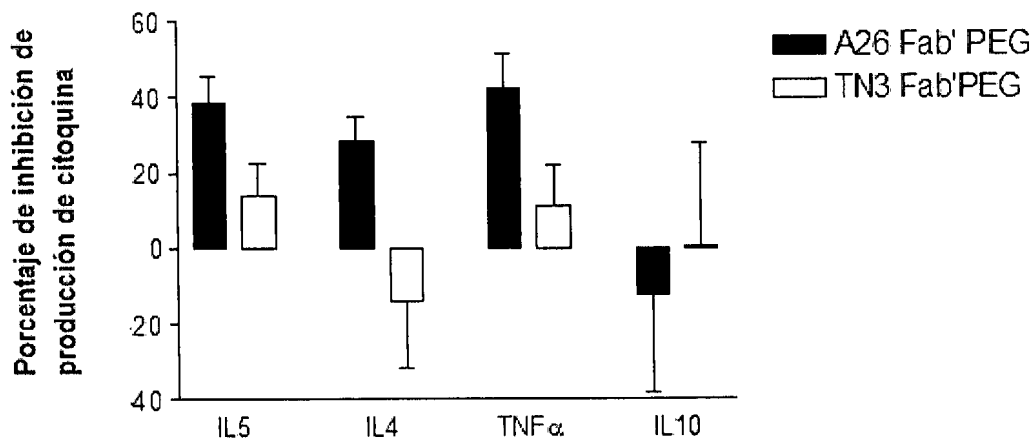
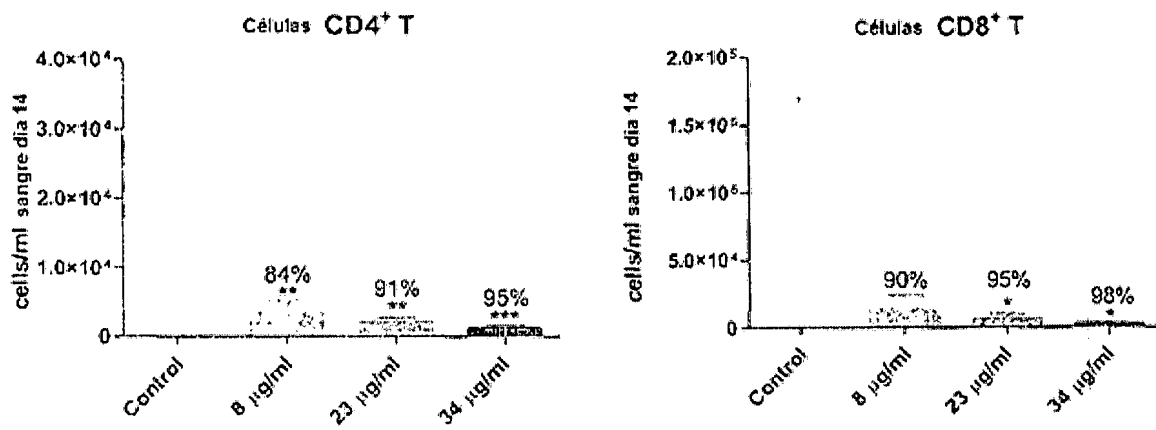


Figura 9



000059

Figura 10

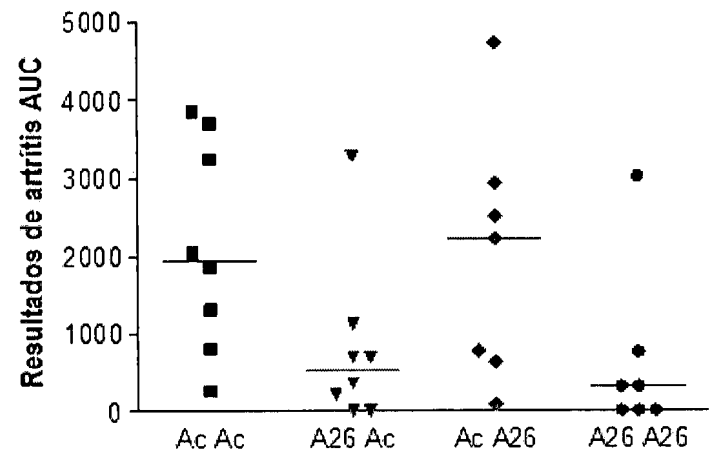
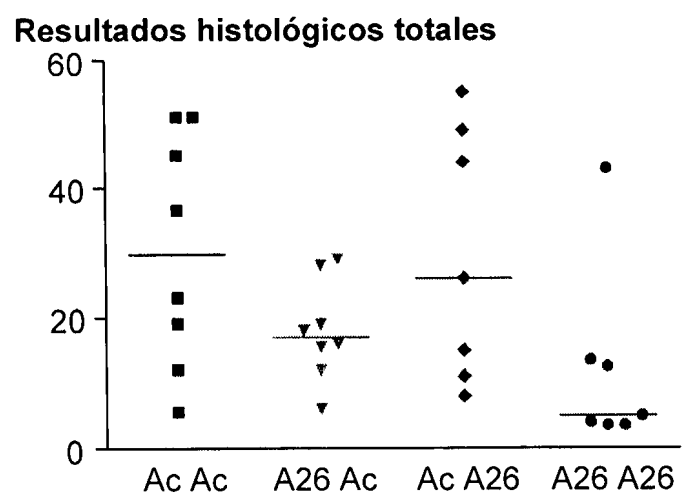


Figura 11



000060

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UCB Pharma S.A.
LAWSON, Alastair
NESBITT, Andrew
POPPLEWELL, Andrew
SHAW, Stevan
SHPEKTOR, Diana
ZHANG, Yi

<120> Moléculas de anticuerpo que tienen especificidad por OX40

<130> G0088-W001

<150> US61/153038

<151> 2009-02-17

<160> 23

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDRH1

<400> 1

Asn Tyr Gly Ile His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDRH2

<400> 2

000061

Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3

<400> 3

Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr
1 5

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

<220>
<223> CDRL1

<400> 4

Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala Leu Ala
1 5 10

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

<220>
<223> CDRL2

000062

<400> 5

Asn Ala Asn Thr Leu His Thr

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDRL3

<400> 6

Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 7

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera del anticuerpo A26

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

000083

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

50

55

60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 8
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera que codifica ADN del anticuerpo A26

<400> 8

gatatccaga tgacccagag tccaagcagt ctctccgccg gcgtaggcga tcgtgtgact 60
 attacctgtc gtgcaaccca gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg 120
 ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataccgg tgttccgtct 180
 cgtttctctg cgtctgggtc tggtagggac tctactctga ccactctctc tctgcagccg 240
 gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttggtggt 300
 ggtaccaaag ttgagatcaa acgt 324

<210> 9
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena pesada del anticuerpo A26

000364

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10

<211> 351

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena pesada que codifica ADN del anticuerpo A26

<400> 10

000065

gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc 60
tcttgtgcag caagcgggtt cacgttcacc aactacggta tccactggat tcgtcaggca 120
ccaggtaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctggtggtct gacgtactac 180
cgtgactctg tcaaaggctg tttcaccatc tctcgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac 240
ctgcagatga actctctgcg tgcagaagat accgcagtgt actactgcgc tactgggtgt 300
gaaggatatct tcgactactg gggtcagggt accctggtaa ctgtctcgag c 351

<210> 11
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena ligera del anticuerpo A26

<400> 11

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu

000386

85

90

95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 12

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera del anticuerpo A26 que incluye secuencia de señal

<400> 12

000067

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
20 25 30

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln
35 40 45

Ser Ile Tyr Asn Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
50 55 60

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro
65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175

000000

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 13
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena ligera que codifica ADN del anticuerpo A26

<400> 13
 gatattccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgccga gcgtaggcga tcgtgtgact 60
 attacctgtc gtgcaacca gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg 120
 ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataccgg tgttccgtct 180
 cgtttctctg cgtctgggtc tggtagcgac tctactctga ccactctctc tctgcagccg 240
 gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttggtggt 300
 ggtaccaaag ttgagatcaa acgtacgggt gcagctccat ccgtcttcat ctttccaccg 360
 tctgacgaac agtcaaatac tggtagctgt tctgtcggtt gcctcctgaa caacttctat 420
 ccgcgtgaag cgaaagtcca gtggaaagtc gacaacgcac tccagtctgg taactctcag 480
 gaatctgtga ccgaacagga ctccaaagac tccacctact ctctgtctag caccctgact 540

000089

ctgtccaaag cagactacga gaaacacaaa gtgtacgctt gcgaagttac ccatcagggt 600

ctgtcttctc cggttaccaa aagctttaat agaggggagt gttaa 645

<210> 14

<211> 708

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera que codifica ADN del anticuerpo A26 que incluye secuencia de señal

<400> 14

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggtg gtttcgctac cgtagcgcaa 60

gctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120

actattacct gtcgtgcaac ccagagcatc tacaacgctc tggcttggtg tcagcagaaa 180

cggggtaaag cgccaaaact cctgatctac aacgcgaaca ctctgcatac cgggtgttcg 240

tctcgtttct ctgcgtctgg ttctggtagc gactctactc tgaccatctc ctctctgcag 300

ccggaagatt tcgcgaccta ctactgccag cagtactacg attacccact gacgtttggt 360

ggtggtacca aagttgagat caaacgtacg gttgcagctc catccgtctt catctttcca 420

ccgtctgacg aacagctcaa atctgggtact gcttctgtcg tttgcctcct gaacaacttc 480

tatccgcgtg aagcgaaagt ccagtggaaa gtcgacaacg cactccagtc tggtaactct 540

caggaatctg tgaccgaaca ggactccaaa gactccacct actctctgtc tagcaccctg 600

actctgtcca aagcagacta cgagaaacac aaagtgtacg cttgcgaagt taccatcag 660

ggtctgtctt ctccggttac caaaagcttt aatagagggg agtggttaa 708

<210> 15

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial

000070

<220>

<223> Cadena pesada del anticuerpo A26

<400> 15

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 Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

000071

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

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

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

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

Thr Cys Ala Ala
 225

<210> 16
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena pesada del anticuerpo A26 que incluye secuencia de señal
 <400> 16

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45

Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys

000000

50

55

60

Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr
 65 70 75 80

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

Lys Asn Ser Pro Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp
 115 120 125

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

000073

225

230

235

240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Ala

245

<210> 17

<211> 687

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada que codifica ADN del anticuerpo A26

<400> 17

gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc 60

tcttgtgcag caagcggttt cacgttcacc aactacggta tccactggat tcgtcaggca 120

ccaggtaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctggtggtct gacgtactac 180

cgtgactctg tcaaaggctg tttcaccatc tctcgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac 240

ctgcagatga actctctgcg tgcagaagat accgcagtgt actactgcgc tactgggtgt 300

gaaggatatct tcgactactg gggtcagggt accctggtaa ctgtctcgag cgcttctacc 360

aaagggtccga gcgttttccc actggctccg agctctaaat ccacctctgg tggtagggct 420

gcactggggtt gcctggtgaa agactacttc ccagaaccag ttaccgtgtc ttggaactct 480

ggtgactga cctctgggtgt tcacaccttt ccagcagttc tgcagtcttc tggctctgtac 540

tccctgtcta gcgtgggttac cgttccgtct tcttctctgg gtactcagac ctacatctgc 600

aacgtcaacc acaaaccgtc caacacgaaa gtggacaaaa aagtcgagcc gaaatcctgt 660

gacaaaaccc atacctgcgc tgcgtaa 687

<210> 18

<211> 750

<212> ADN

000074

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada que codifica ADN del anticuerpo A26 que incluye secuencia de señal

<400> 18

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa	60
gctgagggttc agctgggtcga gtctggaggc gggcttgtcc agcctggagg gagcctgcgt	120
ctctcttgtg cagcaagcgg ttccacgttc accaactacg gtatccactg gattcgtcag	180
gcaccaggta aaggtctgga atgggtagcc tctatctctc cgtctggtgg tctgacgtac	240
taccgtgact ctgtcaaagg tcgtttcacc atctctcgtg atgacgcgaa aaactctccg	300
tacctgcaga tgaactctct gcgtgcagaa gataccgcag tgtactactg cgctactggt	360
ggtgaaggta tcttcgacta ctgggggtcag ggtaccctgg taactgtctc gagcgcttct	420
accaaaggtc cgagcgtttt cccactggct ccgagctcta aatccacctc tggtggtacg	480
gctgcactgg gttgcctggt gaaagactac ttcccagaac cagttaccgt gtcttggaac	540
tctggtgcac tgacctctgg tgttcacacc ttccagcag ttctgcagtc ttctgggtctg	600
tactccctgt ctagcgtggt taccgttccg tcttcttctc tgggtactca gacctacatc	660
tgcaacgtca accacaaacc gtccaacacg aaagtggaca aaaaagtoga gccgaaatcc	720
tgtgacaaaa ccatacctg cgctgcgtaa	750

<210> 19

<211> 1459

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada y ligera que codifica ADN del anticuerpo A26 que incluye secuencia intergénica IGS2

<400> 19

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac cgtagcgcaa	60
---	----

000075

gctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg	120
actattacct gtctgtgcaac ccagagcacc tacaacgctc tggcttggtg tcagcagaaa	180
ccgggtaaaag cgccaaaact cctgatctac aacgcgaaca ctctgcatac cgggtgttccg	240
tctcgttttct ctgcgtctgg ttctggtagc gactctactc tgaccatctc ctctctgcag	300
ccggaagatt tcgcgacctc ctactgccag cagtactacg attacccact gacgtttggt	360
ggtggtacca aagttgagat caaacgtacg gttgcagctc catccgtctt catctttcca	420
ccgtctgacg aacagctcaa atctggtagt gcttctgtcg ttgacctctt gaacaacttc	480
tatccgcgtg aagcgaaaagt ccagtggaaa gtcgacaacg cactccagtc tggtaactct	540
caggaatctg tgaccgaaca ggactccaaa gactccacct actctctgtc tagcaccctg	600
actctgtcca aagcagacta cgagaaacac aaagtgtacg cttgcgaagt taccatcag	660
ggtctgtctt ctccggttac caaaagcttt aatagagggg agtggttaaaa tgaagaagac	720
tgctatagca attgcagtgg cgctagctgg ttccgccacc gtggcgcaag ctgaggttca	780
gctggtcgag tctggaggcg ggcttgtcca gcctggaggg agcctgcgtc tctcttgtgc	840
agcaagcggg ttacagttca ccaactacgg tatccactgg attcgtcagg caccaggtaa	900
aggtctggaa tgggtagcct ctatctctcc gtctggtggt ctgacgtact accgtgactc	960
tgtcaaaggt cgtttcacca tctctctgtg tgacgcgaaa aactctccgt acctgcagat	1020
gaactctctg cgtgcagaag ataccgcagt gtactactgc gctactggtg gtgaaggat	1080
cttcgactac tggggtcagg gtaccctggg aactgtctcg agcgcttcta ccaaaggctc	1140
gagcgttttc cactggctc cgagctctaa atccacctct ggtggtacgg ctgcactggg	1200
ttgcctggtg aaagactact tcccagaacc agttaccgtg tcttggaact ctggtgcact	1260
gacctctggt gttcacacct ttccagcagt tctgcagtct tctggtctgt actccctgtc	1320
tagcgtgggt accgttccgt cttcttctct gggtactcag acctacatct gcaacgtcaa	1380

000076

ccacaaaccg tccaacacga aagtggacaa aaaagtcgag ccgaaatcct gtgacaaaac 1440

ccataacctgc gctgcgtaa 1459

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2

<400> 20

Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL1

<400> 21

Arg Ala Thr Glu Asp Ile Tyr Asn Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

000J77

<223> JH4 humano

<400> 22

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> JK1 secuencia

<400> 23

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

000078

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



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0040121

Bogotá D.C., Abril 29 de 2013 - 15:44:16

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 83.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	23071	07/03/2013		206.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23073	07/03/2013		206.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23074	07/03/2013		206.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23098	07/03/2013		320.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23099	07/03/2013		320.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23105	07/03/2013		480.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23108	07/03/2013		480.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23109	07/03/2013		480.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23155	07/03/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23156	07/03/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23158	07/03/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23159	07/03/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23160	07/03/2013		530.000.00

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-100099-00007-0000
Fecha: 2013-05-08 15:15:32 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 80

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	450.000.00	450.000.00
			\$450.000.00

SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-115133-00000-0000
Fecha: 2013-05-08 15:15:32 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 80

000079

Web: www.sic.gov.co e-mail: Inf

Abril 29 de 2013 - 15:44:18

Center: (571) 6513240

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 13 - 0042753	
				Bogotá D.C., Mayo 07 de 2013 - 11:26:11	
RECIBIDO DE : CLARKE MODET				NI 83.008.643	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	10090	01/02/2013		175.000.00
RECIBO DE CA	999999999	40908	30/04/2013		530.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO			Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
12 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC			30.000.00	360.000.00
					\$360.000.00
=====					
SON: **TRESCIENTOS SESENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO					
					
No. 11-100099- -00007-0000					
Fecha: 2013-05-08 15:15:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR					
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI					
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 80					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO06					
					
No. 13-115133- -00000-0000					
Fecha: 2013-05-08 15:15:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR					
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI					
Act. 411 PRESENTACION Folios: 80					
000580					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Mayo 7 de 2013 - 11:26:12					