

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-099147- -00000-0000

Fecha: 2014-05-08 17:01:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 119 120

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

MOLÉCULAS QUE SON ANTICUERPOS CON ESPECIFICIDAD
POR OX40 HUMANO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

UCB PHARMA, S.A.

DOMICILIO

BRUSELAS, BÉLGICA

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C.35.456.344 de USAQUÉN

22. BOGOTÁ, D.C.,



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Fecha: 2014-05-08 17:01:36
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 119/120

Superintendencia de Industria y Comercio



No. 14-099147- -00000-0000

DIRECCIÓN DE NU
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/EP2012/072325	Fecha 2012/11/09
Publicación Internacional No.		WO 2013/068563 A3	Fecha 2013/05/16
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
MOLÉCULAS QUE SON ANTICUERPOS CON ESPECIFICIDAD POR OX40 HUMANO			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
A61K 039/000, A61K 039/395, C07K 016/000, C07K 016/028, C07K 016/044, C07K 016/046			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
UCB PHARMA, S.A			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		60 Allée de la Recherche, B-1070, Bruselas, Bélgica.	No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD		Bruselas	CORREO ELECTRÓNICO clientes@cavelier.com
DEPARTAMENTO/ESTADO			NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		Bélgica.	Bélgica.
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. ADAMS		Ralph	Británico
2. BHATTA		Pallavi	Británico
3. HEYWOOD		Sam Phillip	Británico
4. HUMPHREYS		David Paul	Británico
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Reino Unido		Berkshire	IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido.
2. Reino Unido		Berkshire	IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido.
3. Reino Unido		Berkshire	IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido
4. Reino Unido		Berkshire	IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido

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 De Páez		NOMBRES Luz Clemencia	IDENTIFICACIÓN C.C . 35.456.344 T.P . 23.555
DIRECCIÓN	Carrera 4ª No. 72-35		No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD	BOGOTA		CORREO ELECTRÓNICO <u>cavelier@cavelier.com</u>
PAÍS	COLOMBIA		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN U.S.A		CÓDIGO PAÍS US	(31) NÚMERO 61/558,545 (32) FECHA (AAAA/MM/DD) 2011/11/11
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>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.</i>			
☐ 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		
<i>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.</i>			
☐ 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		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ 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 14-0047568 Nº 14-0047780	Fecha 2014/05/06 Fecha 2014/05/07
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL		
<i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>			
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ		Firma <i>Luz Clemencia De Páez</i> <i>TP#23555 CSJ</i>	
C.C 35.456.344 de Usaquén		Tarjeta Profesional 23.555	

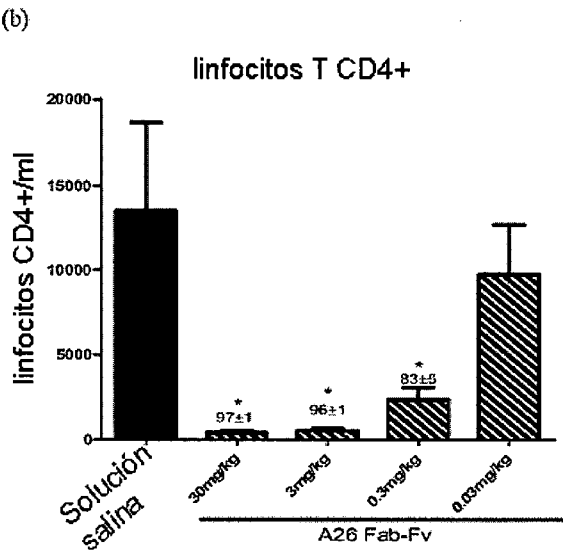
17	ANEXOS
----	--------

Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: 61 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 20 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 17 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☒ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.	Documentación Jurídica 9. ☒ Poder de UCB PHARMA, S.A. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ 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 por \$515.000. 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 10 reivindicaciones adicionales a 10 por \$310.000.
---	--



FIGURA CARACTERISTICA

Figura 10



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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(10) International Publication Number
WO 2013/068563 A3

(43) International Publication Date
16 May 2013 (16.05.2013)

- (51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2012/072325

(22) International Filing Date:
9 November 2012 (09.11.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/558,545 11 November 2011 (11.11.2011) US

(71) Applicant: UCB PHARMA S.A. [BE/BE]; 60 Allée de la Recherche, B-1070 Brussels (BE).

(72) Inventors: ADAMS, Ralph; IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough Berkshire SL1 3WE (GB). BHATTA, Pallavi; IPD, Ucb Celltech, 208 Bath Road, Slough Berkshire SL1 3WE (GB). HEYWOOD, Sam Phillip; IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough Berkshire SL1 3WE
- (GB). HUMPHREYS, David Paul; IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough Berkshire SL1 3WE (GB).

(74) Agent: BLANCHARD, Amanda; UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough Berkshire SL1 3WE (GB).

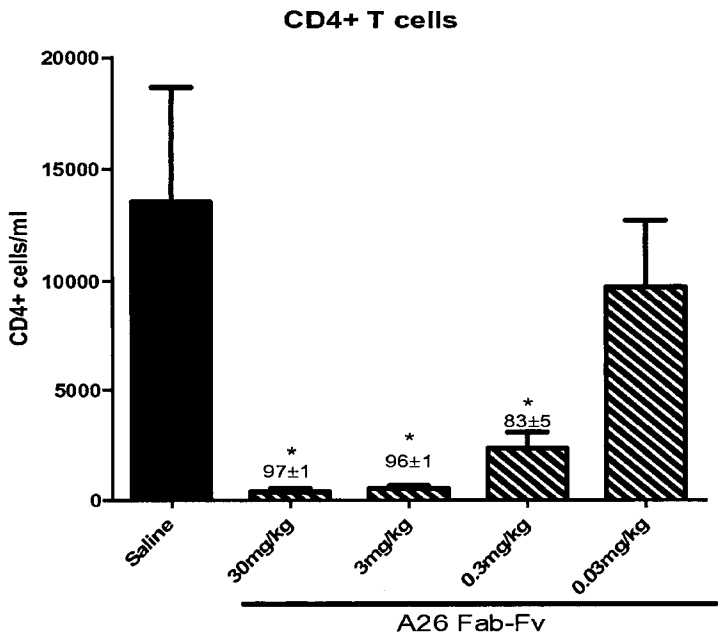
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

[Continued on next page]

(54) Title: ANTIBODY MOLECULES HAVING SPECIFICITY FOR HUMAN OX40

Figure 10
(b)



(57) Abstract: The invention relates to antibody molecules having specificity for antigenic determinants of human OX40, therapeutic uses of the antibody molecules and methods for producing said antibody molecules.

WO 2013/068563 A3



EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments (Rule 48.2(h))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(88) Date of publication of the international search report:

27 June 2013

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
16 May 2013 (16.05.2013)



(10) International Publication Number
WO 2013/068563 A2

(51) International Patent Classification:

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2012/072325

(22) International Filing Date:

9 November 2012 (09.11.2012)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/558,545 11 November 2011 (11.11.2011) US

(71) Applicant: UCB PHARMA S.A. [BE/BE]; 60 Allée de la Recherche, B-1070 Brussels (BE).

(72) Inventors: ADAMS, Ralph; IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough Berkshire SL1 3WE (GB). BHATTA, Pallavi; IPD, Ucb Celltech, 208 Bath Road, Slough Berkshire SL1 3WE (GB). HEYWOOD, Sam Phillip; IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough Berkshire SL1 3WE

(GB). HUMPHREYS, David Paul; IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough Berkshire SL1 3WE (GB).

(74) Agent: BLANCHARD, Amanda; UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough Berkshire SL1 3WE (GB).

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

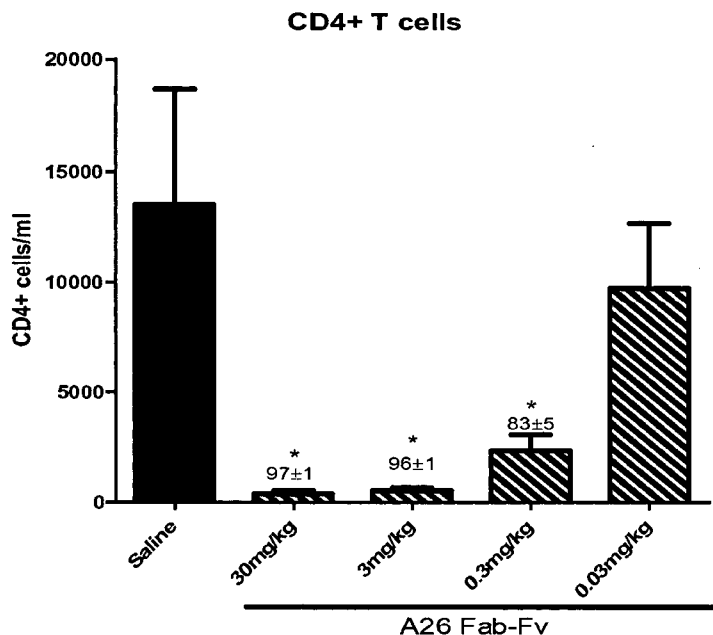
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

[Continued on next page]

(54) Title: ANTIBODY MOLECULES HAVING SPECIFICITY FOR HUMAN OX40

Figure 10

(b)



(57) Abstract: The invention relates to antibody molecules having specificity for antigenic determinants of human OX40, therapeutic uses of the antibody molecules and methods for producing said antibody molecules.

WO 2013/068563 A2

EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

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

MOLÉCULAS QUE SON ANTICUERPOS CON ESPECIFICIDAD POR OX40 HUMANO

La presente invención se refiere a moléculas que son anticuerpos con especificidad por determinantes antigénicos de OX40 y a composiciones que los comprenden. La presente invención también se refiere a los usos terapéuticos de las moléculas que son anticuerpos, las composiciones y a métodos para producir dichas moléculas que son anticuerpos.

OX40 (que también se conoce como CD134, TNFRSF4, ACT35 o TXGP1L) es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF, la cual incluye 4-1BB, CD27, CD30 y CD40. El dominio de unión al ligando extracelular de OX40 está compuesto por 3 dominios ricos en cisteína (CRD) completos y un cuarto CRD C-terminal parcial (Bodmer *et al.*, 2002, *Trends Biochem Sci*, 27, 19-26).

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, *Structure*, 14, 1321-1330).

OX40 es un receptor unido a la membrana; a pesar de ello, también se ha detectado una isoforma soluble (Taylor y Schwarz, 2001, *J. Immunol. Methods*, 255, 67-72). En la actualidad se desconoce la importancia funcional de la forma soluble. OX40 no se expresa en linfocitos T en reposo, pero se expresa de forma transitoria en linfocitos T activados tras la unión del receptor del linfocito T (TCR). El ligando para OX40, OX40L, es un miembro de la familia de TNF y se expresa en células presentadoras de antígenos activadas (APC), que incluyen linfocitos B, macrófagos, células endoteliales y células dendríticas (DC).

OX40 es un receptor coestimulador importante y requiere la participación secuencial de CD28 y OX40 para la supervivencia y la proliferación óptima de los linfocitos T. La unión de OX40 a linfocitos T activados provoca una mayor producción de citocinas y la proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+ (Gramaglia *et al.*, 2000, *J. Immunol*, 165, 3043-3050, Bansal-Pakala *et al.*, 2004,

J. Immunol., 172, 4821-425) y puede participar en las respuestas de Th1 y Th2 en curso (Gramaglia *et al.*, 1998, *J. Immuno.*, 161, 6510-6517, Arestides *et al.*, 2002, *Eur. J. Immunol.* 32, 2874-2880). La coestimulación de OX40 prolonga la supervivencia de los linfocitos T más allá de la fase efectora inicial de la respuesta inmunitaria e incrementa el número de linfocitos T de memoria mediante la inhibición de la muerte de los linfocitos T efectores.

Cuando la activación inmunitaria es excesiva o incontrolada, se puede producir una alergia patológica, asma, inflamación, enfermedades autoinmunitarias y otras enfermedades relacionadas. Debido a que OX40 actúa potenciando las respuestas inmunitarias, puede agravar las enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias.

Se ha demostrado la función de las interacciones OX40/OX40L para modelos de enfermedades en ratones que carecen de OX40. Para la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), un modelo de esclerosis múltiple, se observaron menos signos clínicos graves y un infiltrado inflamatorio reducido en el SNC en ratones que carecían de OX40 (Carboni *et al.*, 2003, *J. Neuroimmunology*, 145, 1-11). Además, los ratones que carecían de OX40 cebados y estimulados con ovoalbúmina exhibieron una reducción de la inflamación pulmonar (reducción de un 80-90% de la eosinofilia), una reducción de la producción de mucosidad y una hiperreactividad de las vías respiratorias significativamente atenuada (Jember *et al.*, 2001, *J. Exp. Med.*, 193, 387-392). Los anticuerpos monoclonales para el ligando OX40 de murinos han presentado efectos beneficiosos en el modelo de artritis reumatoide de tipo artritis inducida por colágeno (Yoshioka *et al.*, 2000, *Eur. J. Immunol.*, 30, 2815-2823), EAE (Nohara *et al.*, 2001, *J. Immunol.*, 166, 2108-2115), ratones diabéticos no obesos (NOD) (Pakala *et al.*, 2004, *Eur. J. Immunol.*, 34, 3039-3046), colitis en ratones con linfocitos T restaurados (Malmstrom *et al.*, 2001, *J. Immunol.*, 166, 6972-6981, Totsuka *et al.*, 2003, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 284, G595-G603) y modelos de inflamación pulmonar (Salek-Ardakani *et al.*, 2003, *J. Exp. Med.*, 198, 315-324, Hoshino *et al.*, 2003, *Eur. J. Immunol.*, 33, 861-869). Se ha probado un anticuerpo para OX40L humano en

un modelo de inflamación pulmonar en macacos Rhesus y ha dado como resultado una reducción de los niveles de IL-5, IL-13 y linfocitos T de memoria efectores en fluido de lavado bronquial después de la estimulación con un alérgeno (Seshasayee *et al.*, 2007, *J. Clin. Invest.*, 117, 3868-3878).

Se ha observado un incremento de la expresión de OX40 en varias enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias. Esto incluye un incremento de la expresión de OX40 en linfocitos T aislados del fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (Brugnoni D *et al.*, 1998, *Br. J. Rheum.*, 37, 584-585; Yoshioka *et al.*, 2000, *Eur. J. Immunol.*, 30, 2815-2823; Giacomelli R *et al.*, 2001, *Clin. Exp. Rheumatol.*, 19, 317-320). De forma similar, se ha observado un incremento de la expresión de OX40 en tejido gastrointestinal de pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn (Souza *et al.*, 1999, *Gut*, 45, 856-863; Stuber *et al.*, 2000, *Eur. J. Clin. Invest.*, 30, 594-599) y en lesiones activas de pacientes con esclerosis múltiple (Carboni *et al.*, 2003, *J. Neuroimmunology*, 145, 1-11). OX40L también se puede detectar en el músculo liso de las vías respiratorias (ASM) de seres humanos y las células de ASM de pacientes con asma presentan unas respuestas inflamatorias mayores frente a la unión de OX40L que los donantes sanos, lo cual indica que la vía de OX40/OX40L desempeña una función en el asma (Burgess *et al.*, 2004, *J. Allergy Clin Immunol.*, 113, 683-689; Burgess *et al.*, 2005, *J. Allergy Clin Immunol.*, 115, 302-308). También se ha descrito que los linfocitos T CD4⁺ aislados de la sangre periférica de pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE) expresan niveles elevados de OX40 que se asocian con la actividad de la enfermedad (Patschan *et al.*, 2006, *Clin. Exp. Immunol.*, 145, 235-242).

Dada la función de OX40 en la alergia, el asma y enfermedades asociadas con la autoinmunidad y la inflamación, una estrategia para la terapia en estas enfermedades consiste en bloquear la señalización OX40-OX40L mediante el uso de anticuerpos anti-OX40L o anticuerpos anti-OX40 antagonistas.

Los anticuerpos anti-OX40L han sido descritos, remítase, por ejemplo, al documento WO2006/029879.

Se han descrito numerosos anticuerpos anti-OX40 agonistas, pero se conocen muy pocos anticuerpos anti-OX40 antagonistas. Stuber *et al.*, 1996, *J. Exp. Med*, 183, 979-989 han generado un anticuerpo policlonal anti-OX40 de ratón producido en conejo, el cual bloquea la interacción entre OX40 y OX40L. Imura *et al.*, 1996, *J. Exp. Med*, 2185-2195 han generado anticuerpos monoclonales de ratón, 131 y 315, los cuales se unen a OX40 humano.

En el documento WO2007/062245 se han descrito anticuerpos antagonistas totalmente humanos; el anticuerpo de afinidad más elevada tenía una afinidad por OX40 expresado en la superficie celular (linfocitos T activados) de 11 nM.

En el documento WO2008/106116 se han descrito anticuerpos antagonistas humanizados y el anticuerpo con la mejor afinidad por OX40 tenía una afinidad de 0.94 nM.

Se han descrito otros anticuerpos anti-OX40, que incluyen L106 de murino (Patente de EE. UU. N.º 6.277.962) y ACT35 de murino, los cuales se pueden adquirir del proveedor comercial eBioscience.

Hemos descrito previamente anticuerpos anti-OX40 antagonistas de alta afinidad en la Solicitud de Patente Internacional número WO2010/096418.

También hemos descrito previamente, en la Solicitud de Patente Internacional número WO2010/035012, una molécula de fusión que es un anticuerpo multiespecífico novedoso, que se denomina en lo sucesivo en la presente Fab-dsFv y se ilustra en la Figura 1 de la presente. La misma solicitud proporciona regiones variables de unión anti-albúmina útiles, las cuales se pueden utilizar para prolongar la semivida de la molécula.

En la presente invención, estas regiones variables de unión a albúmina han sido mejoradas y combinadas en el formato Fab-dsFv con los anticuerpos anti-OX40 descritos en WO2010/096418. La nueva molécula biespecífica de la presente invención presenta una eficacia mejorada en una serie de ensayos *in vivo* e *in vitro* que se describen en la presente en comparación con la molécula Fab'-PEG descrita previamente en WO2010/096418. Por consiguiente, la presente invención proporciona una proteína de fusión que es un anticuerpo

biespecífico, la cual se une tanto a OX40 humano como a albúmina de suero humano y la cual es adecuada para su uso en el tratamiento o la profilaxis de trastornos patológicos mediados por OX40 o asociados con un incremento del nivel de OX40.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una fusión que es un anticuerpo biespecífico de la presente invención (formato Fab-dsFv).

Las Figuras 2-8 muestran ciertas secuencias de ADN o de aminoácidos relacionadas con un anticuerpo de acuerdo con la descripción.

La Figura 9a muestra la unión de A26 Fab-dsFv marcado con AlexaFluor 488 a linfocitos T CD4⁺OX40⁺ humanos activados.

La Figura 9b muestra la unión para A26 Fab', A26 Fab-Fv y A26 Fab'-PEG en presencia de HSA al 5% en linfocitos T CD4⁺, OX40⁺ humanos activados.

La Figura 10a muestra el efecto de A26 Fab-dsFv sobre la producción de citocinas en PBMC expuestas a un extracto alergénico de *Dermatophagoides pteronyssinus*.

La Figura 10b muestra la capacidad de A26 Fab-dsFv para inhibir la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en un modelo con ratones Hu-NSG.

La Figura 11a muestra la inhibición de la unión de OX40L a linfocitos T CD4⁺ OX40⁺ activados humanos por parte de A26 Fab-dsFv.

La Figura 11b muestra la inhibición de la unión de OX40L a linfocitos T CD4⁺ OX40⁺ activados humanos por parte de A26 Fab', A26 Fab-dsFv, A26 Fab'-PEG y dos controles.

La Figura 12a muestra que A26 Fab-Fv inhibe la reacción de linfocitos mixtos (MLR) en seres humanos.

La Figura 12b muestra que A26 Fab-Fv inhibe la producción de IFN-gamma durante la MLR en seres humanos.

La Figura 13 muestra que A26 Fab-Fv reduce el porcentaje de linfocitos T (CD25⁺) CD4⁺ activados después de una reestimulación del antígeno secundario con un extracto alergénico de *Dermatophagoides pteronyssinus*.

La Figura 14 muestra que cuando Fab-Fv y Fab-PEG se administran antes de la transferencia celular, inhiben de forma dependiente de la dosis la proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+ en el modelo Hu-NSG.

El anticuerpo humanizado anti-OX40 CA044_00026 se denomina en la presente A26.

La molécula de fusión que es un anticuerpo de la presente invención, denominada en la presente Fab-dsFv, se ilustra en la Figura 1. En la presente invención, la porción Fab (que comprende las primeras regiones variables de la cadena ligera y pesada y los dominios constantes) se une a OX40 humano y la porción dsFv (que comprende las segundas regiones variables de la cadena ligera y pesada, unidas por un enlace disulfuro) se une a la albúmina de suero humano. En particular, la porción Fab comprende CDR derivadas de un anticuerpo anti-OX40 antagonista y la porción Fv comprende las regiones variables de la cadena ligera y pesada de un anticuerpo humanizado anti-albúmina y estas regiones variables de unión a albúmina están conectadas mediante un enlace disulfuro.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico, la cual se une a OX40 humano y a albúmina de suero humano, que comprende:

- una cadena pesada que comprende, en secuencia desde el extremo N-terminal, un primer dominio variable de la cadena pesada (V_{H1}), un dominio $CH1$ y un segundo dominio variable de la cadena pesada (V_{H2}),

- una cadena ligera que comprende, en secuencia desde el extremo N-terminal, un primer dominio variable de la cadena ligera (V_{L1}), un dominio CL y un segundo dominio variable de la cadena ligera (V_{L2}),

donde dichas cadenas ligera y pesada están alineadas de un modo tal que V_{H1} y V_{L1} forman un primer sitio de unión al antígeno y V_{H2} y V_{L2} forman un segundo sitio de unión al antígeno,

donde el antígeno que se une al primer sitio de unión al antígeno es OX40 humano y el antígeno que se une al segundo sitio de unión al antígeno es albúmina de suero humano, en particular

donde el primer dominio variable de la cadena pesada (V_H1) comprende la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:1 para CDR-H1, la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:2 para CDR-H2 y la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:3 para CDR-H3 y el primer dominio variable de la cadena ligera (V_L1) comprende la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:4 para CDR-L1, la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:5 para CDR-L2 y la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:6 para CDR-L3,

donde el segundo dominio variable de la cadena pesada (V_H2) tiene la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:11 y el segundo dominio variable de la cadena ligera (V_L2) tiene la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO: 12 y

el segundo dominio variable de la cadena pesada (V_H2) y el segundo dominio variable de la cadena ligera (V_L2) están conectados mediante un enlace disulfuro.

Los residuos en los dominios variables de los anticuerpos se numeran convencionalmente según un sistema ideado por Kabat *et al.* Este sistema se expone en Kabat *et al.*, 1987, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services, NIH, EE. UU. (en lo sucesivo en la presente "Kabat *et al.* (*supra*)"). En la presente memoria descriptiva se utiliza este sistema de numeración excepto cuando se indique de otro modo.

Las designaciones de los residuos de Kabat no siempre corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos aminoacídicos. La secuencia lineal real de aminoácidos puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que en la numeración estricta de Kabat corresponden a un acortamiento de, o una inserción en, un componente estructural, ya sea una región marco o una región determinante de la complementariedad (CDR), de la estructura básica del dominio variable. La numeración correcta de Kabat de los residuos se puede determinar para un anticuerpo dado alineando residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar".

Las CDR del dominio variable de la cadena pesada están localizadas en los residuos 31-35 (CDR-H1), residuos 50-65 (CDR-H2) y residuos 95-102 (CDR-H3) según el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, según Chothia (Chothia, C. y Lesk, A.M. *J. Mol. Biol.*, 196, 901-917 (1987)), el bucle equivalente a CDR-H1 se extiende desde el residuo 26 hasta el residuo 32. Por lo tanto, a menos que se indique de otro modo, se pretende que el término "CDR-H1", tal como se utiliza en la presente, se refiera a los residuos 26-35, como se describe mediante una combinación del sistema de numeración de Kabat y la definición topológica de bucle de Chothia.

Las CDR del dominio variable de la cadena ligera están localizadas en los residuos 24-34 (CDR-L1), residuos 50-56 (CDR-L2) y residuos 89-97 (CDR-L3) según el sistema de numeración de Kabat.

La proteína de fusión biespecífica de la presente invención comprende un fragmento Fab del anticuerpo anti-OX40 antagonista que se ha descrito previamente en WO2010/096418. El término "antagonista", tal como se utiliza en la presente, describe una proteína de fusión que es un anticuerpo capaz de inhibir y/o neutralizar la actividad de señalización biológica de OX40, por ejemplo, bloqueando la unión, o reduciendo sustancialmente la unión, de OX40 al ligando de OX40 e inhibiendo de este modo la activación de OX40.

El cribado de anticuerpos para identificar los que se unen a OX40 se puede llevar a cabo utilizando ensayos para medir la unión a OX40 humano y/o ensayos para medir la capacidad para bloquear la unión de OX40 a su ligando, OX40L. Un ejemplo de un ensayo de unión es un ELISA, en particular, que utiliza una proteína de fusión de OX40 humano y Fc humano, la cual se inmoviliza sobre placas, y que emplea un anticuerpo secundario conjugado para detectar el anticuerpo anti-OX40 unido a la proteína de fusión. Un ejemplo de un ensayo de bloqueo es un ensayo basado en citometría de flujo que mide el bloqueo de la unión de la proteína de fusión que tiene OX40 como ligando a OX40 en células CD4 humanas. Para detectar la cantidad de proteína de fusión que tiene OX40 como ligando que se une a la célula, se utiliza un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. En este ensayo se observa una

reducción de la señal a medida que el anticuerpo del sobrenadante bloquea la unión de la proteína de fusión del ligando a OX40. Otro ejemplo de un ensayo de bloqueo es un ensayo en el cual el bloqueo de la coestimulación de linfocitos T humanos vírgenes mediado por la proteína de fusión que tiene OX40 como ligando, la cual se aplica como recubrimiento a una placa, se mide cuantificando la incorporación de timidina con tritio.

En la presente invención, las regiones variables están humanizadas. Los anticuerpos humanizados (que incluyen anticuerpos con injertos de CDR) son moléculas que son anticuerpos con una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) procedentes de una especie no humana y una región marco procedente de una molécula de inmunoglobulina humana (remítase, p. ej., a US 5.585.089 y WO91/09967). Se debe tener en cuenta que quizás solo sea necesario transferir los residuos determinantes de la especificidad de las CDR en lugar de toda la CDR (remítase, por ejemplo, a Kashmiri *et al.*, 2005, *Methods*, 36, 25-34). Los anticuerpos humanizados pueden comprender además opcionalmente uno o más residuos marco derivados de la especie no humana a partir de la cual se obtuvieron las CDR.

En la presente invención, las CDR de V_H1 y V_L1 se obtienen a partir del anticuerpo conocido como A26, que se describe en WO2010/096418. Por consiguiente, en la proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de la presente invención, el primer dominio variable de la cadena pesada (V_H1) comprende la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:1 para CDR-H1, la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:23 para CDR-H2 y la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:3 para CDR-H3 y el primer dominio variable de la cadena ligera (V_L1) comprende la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:4 o la SEQ ID NO:24 para CDR-L1, la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:5 para CDR-L2 y la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:6 para CDR-L3.

Se debe tener en cuenta que se pueden realizar una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos en las CDR proporcionadas en la presente invención sin alterar de forma significativa la capacidad del anticuerpo

para unirse a OX40 y neutralizar la actividad de OX40. El efecto de cualesquiera sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos puede ser evaluado fácilmente por un experto en la técnica, por ejemplo, utilizando los métodos que se describen en WO2010/096418, para determinar la unión a OX40 y la inhibición de la interacción OX40/OX40L. Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico que presenta especificidad por OX40 humano, que comprende CDRH-1 (SEQ ID NO:1), CDRH-2 (SEQ ID NO:2), CDRH-3 (SEQ ID NO:3), CDRL-1 (SEQ ID NO:4), CDRL-2 (SEQ ID NO:5) y CDRL-3 (SEQ ID NO:6) según se muestra en la Figura 2(c), por ejemplo, en el cual uno o más aminoácidos, por ejemplo, 1 o 2 aminoácidos, en una o más de las CDR se ha sustituido por otro aminoácido, tal como un aminoácido similar, según se define posteriormente en la presente.

En una realización, una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de la presente invención comprende una cadena pesada, donde el primer dominio variable de la cadena pesada comprende tres CDR donde la secuencia de CDRH-1 presenta al menos un 90% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:1, CDRH-2 presenta al menos un 90% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:2 y/o CDRH-3 presenta al menos un 90% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:3. En otra realización, una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de la presente invención comprende una cadena pesada, donde el dominio variable de la cadena pesada comprende tres CDR donde la secuencia de CDRH-1 presenta al menos un 95% o 98% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:1, CDRH-2 presenta al menos un 95% o 98% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:2 y/o CDRH-3 presenta al menos un 95% o 98% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:3.

El término "identidad", tal como se utiliza en la presente, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo

aminoacídico es idéntico entre las secuencias. El término "similitud", tal como se utiliza en la presente, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo aminoacídico es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina se puede sustituir por isoleucina o valina. Otros aminoácidos que se pueden sustituir a menudo el uno por el otro incluyen, sin carácter limitante:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
 - lisina, arginina e 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 tipo amida); y
 - cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre).
- Los grados de identidad y similitud se pueden calcular fácilmente (*Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; *Biocomputing. Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part 1*, Griffin, A.M. y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991, el software BLAST™ que se puede adquirir de NCBI (Altschul, S.F. *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, *Nature Genet.* 3:266-272; Madden, T.L. *et al.*, 1996, *Meth. Enzymol.* 266:131-141; Altschul, S.F. *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, *Genome Res.* 7:649-656).

En otra realización, una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de la presente invención comprende una cadena ligera, donde el primer dominio variable de la cadena ligera comprende tres CDR donde la secuencia de CDRL-1 presenta al menos un 90% de identidad o similitud

respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:4, CDRL-2 presenta al menos un 90% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:5 y/o CDRL-3 presenta al menos un 90% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:6. En otra realización, una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de la presente invención comprende una cadena ligera, donde el primer dominio variable de la cadena ligera comprende tres CDR donde la secuencia de CDRL-1 presenta al menos un 95% o 98% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:4, CDRL-2 presenta al menos un 95% o 98% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:5 y/o CDRL-3 presenta al menos un 95% o 98% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:6.

En una realización, la porción Fab de la proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico proporcionada en la presente invención es una molécula que es un anticuerpo humanizado o con injerto de CDR que comprende una o más de las CDR proporcionadas en las SEQ ID NOs:1, 2, 3, 4, 5 y/o 6 (Figura 2(c)) o sus variantes. La expresión "molécula que es un anticuerpo con injerto de CDR", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una molécula que es un anticuerpo donde la cadena ligera y/o pesada contiene una o más CDR (incluidas, si se desea, una o más CDR modificadas) procedentes de un anticuerpo donante (p. ej., un anticuerpo monoclonal de murino) injertadas en un marco de la región variable de la cadena ligera y/o pesada de un anticuerpo aceptor (p. ej., un anticuerpo humano). Para consultar un artículo de revisión, remítase a Vaughan *et al*, *Nature Biotechnology*, 16, 535-539, 1998. En una realización, en lugar de transferir toda la CDR, solo se transfieren al marco del anticuerpo humano uno o más de los residuos determinantes de la especificidad procedentes de cualquiera de las CDR descritas anteriormente en la presente (remítase, por ejemplo, a Kashmiri *et al.*, 2005, *Methods*, 36, 25-34). En una realización, solo se transfieren al marco del anticuerpo humano los residuos determinantes de la especificidad procedentes

de una o más de las CDR descritas anteriormente en la presente. En otra realización, solo se transfieren al marco del anticuerpo humano los residuos determinantes de la especificidad procedentes de cada una de las CDR descritas anteriormente en la presente.

Cuando se injertan las CDR o los residuos determinantes de la especificidad, se puede utilizar cualquier secuencia adecuada del marco de la región variable aceptora, teniendo en cuenta la clase/tipo del anticuerpo donante a partir del cual se obtienen las CDR, incluidas las regiones marco de ratón, primate y ser humano. De forma adecuada, el anticuerpo con injerto de CDR de acuerdo con la presente invención tiene un dominio variable que comprende regiones marco aceptoras humanas, así como una o más de las CDR o los residuos determinantes de la especificidad descritos anteriormente. De este modo, en una realización se proporciona un anticuerpo con injerto de CDR neutralizante, donde el dominio variable comprende regiones marco aceptoras humanas y CDR donantes no humanas.

Los ejemplos de marcos humanos que se pueden utilizar en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat *et al.*, *supra*). Por ejemplo, KOL y NEWM se pueden utilizar para la cadena pesada, REI se puede utilizar para la cadena ligera, y EU, LAY y POM se pueden utilizar tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. Como alternativa, se pueden utilizar secuencias de líneas germinales humanas; estas se pueden adquirir en: <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>

En un anticuerpo con injerto de CDR de la presente invención, no es necesario que las cadenas ligera y pesada aceptoras se obtengan forzosamente a partir del mismo anticuerpo y, si se desea, pueden comprender cadenas compuestas que tengan regiones marco derivadas de diferentes cadenas.

Una región marco adecuada para el primer dominio variable de la cadena pesada (VH1) de la presente invención se obtiene a partir de la secuencia 1-3 3-07 del subgrupo VH3 humano junto con JH4. Una región marco adecuada para la cadena ligera para el primer dominio variable de la

cadena ligera (VL1) se obtiene a partir de la secuencia 2-1 1-02 del subgrupo VK1 de la línea germinal humana junto con JK4.

Además, en una región variable del anticuerpo con injerto de CDR de la presente invención, no es necesario que las regiones marco tengan exactamente la misma secuencia que la del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, los residuos inusuales se pueden cambiar por residuos que aparezcan de forma más frecuente para aquella clase o tipo de cadena aceptora. Como alternativa, los residuos seleccionados en las regiones marco aceptoras se pueden cambiar de forma que correspondan al residuo que se encuentra en la misma posición en el anticuerpo donante (remítase a Reichmann *et al.*, 1998, *Nature*, 332, 323-324). Tales cambios se deberían mantener en el mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donante. En el documento WO 91/09967 se expone un protocolo para seleccionar residuos en las regiones marco aceptoras que pueden requerir cambios.

De forma adecuada, en la primera región variable de la cadena pesada (VH1) de la presente invención, si la cadena pesada aceptora tiene la secuencia 1-3 3-07 de VH3 humana junto con JH4, entonces las regiones marco aceptoras de la cadena pesada comprenden, además de una o más CDR donantes, un residuo donante en al menos una de las posiciones 37, 73, 78 o 94 (según Kabat *et al.*, (*supra*)). Por consiguiente, se proporciona una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico, donde al menos los residuos en las posiciones 37, 73, 78 y 94 del primer dominio variable de la cadena pesada son residuos donantes.

De forma adecuada, en la primera región variable de la cadena ligera (VL1) de la presente invención, si la cadena ligera aceptora tiene la secuencia 2-1 1-02 del subgrupo VK1 humano junto con JK4, entonces las regiones marco aceptoras de la cadena ligera comprenden, además de una o más CDR donantes, un residuo donante en al menos una de las posiciones 64 o 71. Por consiguiente, se proporciona una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico, donde al menos los residuos en las posiciones 64 y 71 del primer dominio variable de la cadena ligera son residuos donantes.

Los residuos donantes son residuos procedentes del anticuerpo donante, es decir, el anticuerpo a partir del cual se obtienen originariamente las CDR.

En una realización, una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de la presente invención comprende una cadena pesada, donde el primer dominio variable de la cadena pesada (V_H1) comprende la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:8 de la Figura 2(b).

Se debe tener en cuenta que se pueden realizar una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos, por ejemplo, 1 o 2 aminoácidos, en los primeros dominios variables de la cadena ligera y pesada, que se proporcionan en la presente invención, sin alterar de forma significativa la capacidad de la proteína de fusión que es un anticuerpo para unirse a OX40 y neutralizar la actividad de OX40. El efecto de cualesquiera sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos puede ser evaluado fácilmente por un experto en la técnica, por ejemplo, utilizando los métodos que se describen en WO2010/096418, para determinar la unión a OX40 y el bloqueo del ligando.

En una realización, una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de la presente invención comprende una cadena pesada, donde el primer dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que presenta al menos un 60% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:8 de la Figura 2(b). En una realización, una proteína de fusión que es un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada (V_H1), donde el primer dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que presenta al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:8.

En una realización, una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de la presente invención comprende una cadena ligera, donde el primer dominio variable de la cadena ligera (V_L1) comprende la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:7 de la Figura 2(a).

En otra realización, una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de la presente invención comprende una cadena ligera, donde el

primer dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que presenta al menos un 60% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:7. En una realización, la proteína de fusión que es un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena ligera, donde el primer dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que presenta al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO: 7.

En una realización, una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de la presente invención comprende una cadena pesada, donde el primer dominio variable de la cadena pesada (VH1) comprende la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:8, y una cadena ligera, donde el primer dominio variable de la cadena ligera (VL1) comprende la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:7.

En otra realización de la invención, la proteína de fusión que es un anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde el primer dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que presenta al menos un 60% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:8 y el primer dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que presenta al menos un 60% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:7. De forma adecuada, la proteína de fusión que es un anticuerpo comprende una cadena pesada, donde el primer dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que presenta al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:8, y una cadena ligera, donde el primer dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que presenta al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:7.

En la proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de la presente invención, la cadena pesada comprende un dominio CH1 y la cadena ligera comprende un dominio CL, ya sea kappa o lambda.

En una realización, una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de la presente invención comprende una cadena pesada, donde la cadena pesada comprende la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:10, y una cadena ligera, donde la cadena ligera comprende la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:9.

Se debe tener en cuenta que se pueden realizar una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos, por ejemplo, 1 o 2 aminoácidos, en los dominios variables y/o constantes del anticuerpo que se proporcionan en la presente invención sin alterar de forma significativa la capacidad del anticuerpo para unirse a OX40 y neutralizar la actividad de OX40. El efecto de cualesquiera sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos puede ser evaluado fácilmente por un experto en la técnica, por ejemplo, utilizando los métodos que se describen en WO2010096418, para determinar la unión a OX40 y el bloqueo de la interacción OX40/OX40L.

En una realización de la invención, la proteína de fusión que es un anticuerpo comprende una cadena pesada, donde los dominios VH1 y CH1 de la cadena pesada comprenden una secuencia que presenta al menos un 60% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:10. De forma adecuada, la fusión que es un anticuerpo comprende una cadena pesada, donde los dominios VH1 y CH1 de la cadena pesada comprenden una secuencia que presenta al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:10.

En una realización, una molécula de fusión que es un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención comprende una cadena ligera que comprende la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:9 de la Figura 2(d).

En una realización de la invención, la proteína de fusión que es un anticuerpo comprende una cadena ligera, donde los dominios VL1 y CH1 de la cadena ligera comprenden una secuencia que presenta al menos un 60% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID

NO:9. Por ejemplo, la proteína de fusión que es un anticuerpo comprende una cadena ligera, donde los dominios VL1 y CL de la cadena ligera comprenden una secuencia que presenta al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:9.

El segundo antígeno que se une a la proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de la presente invención es la albúmina de suero humano. Esta se une a la porción Fv de Fab-dsFv, la cual está constituida por los segundos dominios variables de la cadena ligera y pesada, V_{H2} y V_{L2}. En la presente invención, V_{H2} y V_{L2} se obtienen a partir de los anticuerpos descritos en WO2010/035012 y representan un injerto mejorado más humano de ese anticuerpo.

En una realización, el segundo dominio variable de la cadena pesada (V_{H2}) presenta la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:11 de la Figura 3(a).

En una realización, el segundo dominio variable de la cadena ligera (V_{L2}) presenta la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:12 de la Figura 3(b).

Por consiguiente, la presente invención proporciona una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico, la cual se une a OX40 humano y a albúmina de suero humano, que comprende:

una cadena pesada que comprende, en secuencia desde el extremo N-terminal, un primer dominio variable de la cadena pesada (V_{H1}), un dominio CH1 y un segundo dominio variable de la cadena pesada (V_{H2}),

una cadena ligera que comprende, en secuencia desde el extremo N-terminal, un primer dominio variable de la cadena ligera (V_{L1}), un dominio CL y un segundo dominio variable de la cadena ligera (V_{L2}),

donde dichas cadenas ligera y pesada están alineadas de un modo tal que V_{H1} y V_{L1} forman un primer sitio de unión al antígeno y V_{H2} y V_{L2} forman un segundo sitio de unión al antígeno,

donde el antígeno que se une al primer sitio de unión al antígeno es OX40 humano y el antígeno que se une al segundo sitio de unión al antígeno es albúmina de suero humano,

donde el primer dominio variable de la cadena pesada (V_H1) comprende la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:1 para CDR-H1, la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:2 para CDR-H2 y la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:3 para CDR-H3 y el primer dominio variable de la cadena ligera (V_L1) comprende la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:4 para CDR-L1, la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:5 para CDR-L2 y la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:6 para CDR-L3,

donde el segundo dominio variable de la cadena pesada (V_H2) tiene la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:11 y el segundo dominio variable de la cadena ligera (V_L2) tiene la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO: 12 y

el segundo dominio variable de la cadena pesada (V_H2) y el segundo dominio variable de la cadena ligera (V_L2) están conectados mediante un enlace disulfuro.

Preferentemente, el dominio CH1 y el segundo dominio variable de la cadena pesada (V_H2) están conectados mediante un conector y el dominio CL y el segundo dominio variable de la cadena ligera (V_L2) están conectados mediante un conector. Se puede utilizar cualquier secuencia conectora peptídica adecuada y esta puede ser la misma en cada cadena o diferente. Los conectores adecuados se han descrito previamente en WO2010/035012 y se incorporan a la presente por referencia. En la Figura 3(c) y (d) se muestran ejemplos de conectores adecuados. En una realización, el conector entre el dominio CH1 y el segundo dominio variable de la cadena pesada (V_H2) comprende o está constituido por la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:13 de la Figura 3(c). En una realización, el conector entre el dominio CH1 y el segundo dominio variable de la cadena pesada (V_H2) comprende o está constituido por la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:14 de la

Figura 3(c). En una realización, el conector entre el dominio CL y el segundo dominio variable de la cadena ligera (VL2) comprende o está constituido por la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:14 de la Figura 3(d).

En una realización, el conector en la cadena ligera es una secuencia de 15 aminoácidos, en particular GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 29).

En una realización, el conector en la cadena pesada es una secuencia de 16 aminoácidos, en particular SGGGSGGGGTGGGGS (SEQ ID NO: 30).

En una realización, la presente invención proporciona una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico, donde la cadena pesada comprende o está constituida por la secuencia que se proporciona en la Figura 3(e) (SEQ ID NO:15) y la cadena ligera comprende o está constituida por la secuencia que se proporciona en la Figura 3(f) (SEQ ID NO:16).

En una realización de la invención, la proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende una secuencia que presenta al menos un 60% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:15 y la cadena ligera comprende una secuencia que presenta al menos un 60% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:16. En general, la fusión que es un anticuerpo comprende una cadena pesada, donde la cadena pesada comprende una secuencia que presenta al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:15, y una cadena ligera, donde la cadena ligera comprende una secuencia que presenta al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud respecto a la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:16.

Las moléculas de fusión que son anticuerpos de la presente invención presentan de forma adecuada una afinidad de unión elevada, en particular una afinidad picomolar por OX40 humano y una afinidad nanomolar por la albúmina de suero humano. La afinidad se puede medir utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluida la resonancia de plasmones superficiales, p. ej., BIAcore™, como se describe para OX40 en

WO2010096418 y para la albúmina de suero en WO2010/035012, utilizando OX40 o albúmina de suero naturales aislados o recombinantes o una proteína/polipéptido de fusión adecuado.

En un ejemplo, la afinidad se mide utilizando OX40 humano recombinante de dominio extracelular, como se describe en WO2010/096418. En un ejemplo, el OX40 humano recombinante de dominio extracelular utilizado es un dímero, por ejemplo, un dímero de fusión Fc. De forma adecuada, las moléculas de fusión que son anticuerpos de la presente invención presentan una afinidad de unión para OX40 humano aislado de aproximadamente 200 pM o inferior. En una realización, la molécula que es un anticuerpo de la presente invención presenta una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o inferior. En una realización, la molécula que es un anticuerpo de la presente invención presenta una afinidad de unión de aproximadamente 50 pM o inferior. En una realización, la molécula de fusión que es un anticuerpo de la presente invención presenta una afinidad de unión de aproximadamente 40 pM o inferior.

Las moléculas de fusión que son anticuerpos de la presente invención presentan de forma adecuada una afinidad de unión elevada para OX40 humano que se expresa en la superficie de linfocitos T activados, por ejemplo, una afinidad nanomolar o picomolar. La afinidad se puede medir utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluido el método que se describe en WO2010096418 que utiliza linfocitos T humanos CD4⁺ OX40⁺ activados. En particular, las moléculas de fusión que son anticuerpos de la presente invención presentan una afinidad de unión para OX40 humano que se expresa en la superficie celular de aproximadamente 2 nM o mejor. En un ejemplo, las moléculas que son anticuerpos de la presente invención presentan una afinidad de unión para OX40 humano que se expresa en la superficie celular de aproximadamente 1 nM o mejor. En otro ejemplo, las moléculas que son anticuerpos de la presente invención presentan una afinidad de unión para OX40 humano que se expresa en la superficie celular de aproximadamente 0.5 nM o mejor. En otro ejemplo, las moléculas que son anticuerpos de la presente

invención presentan una afinidad de unión para OX40 humano que se expresa en la superficie celular de aproximadamente 0.2 nM o mejor.

De forma adecuada, las moléculas de fusión que son anticuerpos de la presente invención presentan una afinidad de unión para albúmina de suero humano aislada de aproximadamente 50 nM o inferior. De forma adecuada, las moléculas de fusión que son anticuerpos de la presente invención presentan una afinidad de unión para albúmina de suero humano aislada de aproximadamente 20 nM o inferior. En una realización, la molécula que es un anticuerpo de la presente invención presenta una afinidad de unión de aproximadamente 10 nM o inferior. En una realización, la molécula que es un anticuerpo de la presente invención presenta una afinidad de unión de aproximadamente 5 nM o inferior. En una realización, la molécula de fusión que es un anticuerpo de la presente invención presenta una afinidad de unión de aproximadamente 2 nM o inferior.

Las moléculas de fusión que son anticuerpos de la presente invención se pueden unir a albúmina de suero humano y a albúmina de suero de macaco cangrejero, rata y ratón. En una realización, la proteína de fusión que es un anticuerpo de la presente invención se une a albúmina de suero de macaco cangrejero con una afinidad de 5 nM o inferior. En una realización, la proteína de fusión que es un anticuerpo de la presente invención se une a albúmina de suero de ratón con una afinidad de 5 nM o inferior.

Las moléculas de fusión que son anticuerpos de la presente invención son capaces de unirse a OX40 humano y a albúmina de suero humano de forma simultánea.

De forma beneficiosa, las moléculas de fusión de la presente invención presentan una afinidad elevada por OX40 y también presentan una semivida adecuada *in vivo* para que sean terapéuticamente útiles, por ejemplo, la semivida está comprendida en el intervalo de 5-15 días, tal como 7-11 días.

Se debe tener en cuenta que la afinidad por OX40 humano y/o albúmina de suero humano de la proteína de fusión que es un anticuerpo proporcionada en la presente invención se puede alterar utilizando cualquier método

adecuado conocido en la técnica. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a variantes de las moléculas que son anticuerpos de la presente invención, las cuales presentan una afinidad mejorada por OX40 y por la albúmina de suero humano. Tales variantes se pueden obtener mediante una serie de protocolos de maduración de la afinidad, que incluyen la mutación de las CDR (Yang *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403, 1995), la transposición de cadenas (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10, 779-783, 1992), el uso de cepas mutadoras de *E. coli* (Low *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 250, 359-368, 1996), la transposición de ADN (Patten *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724-733, 1997), la presentación de fagos (Thompson *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Cramer *et al.*, *Nature*, 391, 288-291, 1998). Vaughan *et al.* (*supra*) discuten estos métodos de maduración de la afinidad.

En una realización, las moléculas de fusión que son anticuerpos biespecíficos de la presente invención bloquean la interacción entre OX40 y OX40L. En el documento WO2010/096418 se describen numerosos ensayos adecuados para determinar la capacidad de un anticuerpo para bloquear esta interacción. En una realización, la presente invención proporciona una proteína de fusión que es un anticuerpo con especificidad por OX40 humano, que es capaz de inhibir la unión de OX40L humano (cuando se evalúa con una concentración final de 2 µg/ml) a linfocitos T CD4+OX40+ humanos activados en un 50% con una concentración inferior a 0.5 nM. En una realización, el OX40L humano utilizado en el ensayo es OX40 humano natural. En una realización, el OX40 humano utilizado en el ensayo es OX40 humano recombinante.

Si se desea, un anticuerpo para su uso en la presente invención se puede conjugar con una o más moléculas efectoras. Se debe tener en cuenta que la molécula efectora puede comprender una única molécula efectora o dos o más de tales moléculas enlazadas de modo que formen un único resto que se pueda unir a los anticuerpos de la presente invención. Cuando se desee obtener un fragmento de anticuerpo enlazado a una molécula efectora, esto se puede preparar mediante procedimientos de ADN recombinante o

procedimientos químicos estándar, en los cuales el fragmento de anticuerpo se enlaza directamente o mediante un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar tales moléculas efectoras con anticuerpos son muy conocidas en la técnica (remítase a Hellstrom *et al.*, *Controlled Drug Delivery*, 2.^a ed., Robinson *et al.*, eds., 1987, págs. 623-53; Thorpe *et al.*, 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 y Dubowchik *et al.*, 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los que se describen en WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO 03/031581. Como alternativa, cuando la molécula efectora es una proteína o un polipéptido, la unión se puede conseguir utilizando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo, como se describe en WO 86/01533 y EP0392745.

La expresión "molécula efectora", tal como se utiliza en la presente, incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo, enzimas, otro anticuerpo o fragmentos de anticuerpo, polímeros sintéticos o de origen natural, ácidos nucleicos y sus fragmentos, p. ej., ADN, ARN y sus fragmentos, radionucleidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos marcadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que se pueden detectar mediante espectroscopía ESR o RMN.

Los ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos, incluido cualquier agente que sea perjudicial para las células (p. ej., que las destruya). Los ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maitansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de estos.

Las moléculas efectoras también incluyen, sin carácter limitante, antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, decarbacina), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiaminplatino (II) (DDP), cisplatino), antraciclinas (p. ej., daunorrubicina (antiguamente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej., dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas) y agentes antimitóticos (p. ej., vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionucleidos quelados tales como ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto 213 , Californio 252 , Iridio 192 y Volframio 188 /Renio 188 , o fármacos tales como, sin carácter limitante, alquilfosfocolinas, inhibidores de topoisomerasas I, taxoides y suramina.

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, sin carácter limitante, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, sin carácter limitante, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o la toxina diftérica, una proteína tal como la insulina, el factor de necrosis tumoral, el interferón α , el interferón β , el factor de crecimiento de nervios, el factor de crecimiento derivado de plaquetas o el activador del plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente antiangiogénico, p. ej., angiostatina o endostatina, o un modificador de la respuesta biológica tal como una linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), el factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor de crecimiento de nervios (NGF) u otros factores de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles, por ejemplo, en el diagnóstico. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes,

materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, nucleidos radioactivos, metales emisores de positrones (para su uso en tomografía de emisión de positrones) e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos. Remítase en general a la Patente de EE. UU. N.º 4.741.900 para consultar los iones metálicos que se pueden conjugar con los anticuerpos para su uso en diagnósticos. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, 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, diclorotriazinilaminofluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen el luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y acecuorina; y los nucleidos radioactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

Cuando la molécula efectora es un polímero, en general puede ser un polímero sintético o de origen natural, por ejemplo, un polímero de polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido, o un polisacárido ramificado o no ramificado, p. ej., un homo- o heteropolisacárido.

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

Los ejemplos específicos de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos, o derivados de estos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido, tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados de este.

Los polímeros de origen natural específicos incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de estos.

Se pretende que el término "derivados", tal como se utiliza en la presente, incluya derivados reactivos, por ejemplo, grupos reactivos selectivos

para tiol tales como maleimidias y similares. El grupo reactivo puede estar unido al polímero directamente o a través de un segmento conector. Se debe tener en cuenta que el residuo de un grupo de este tipo formará parte en algunos casos del producto como el grupo conector entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero se puede modificar según se desee, pero generalmente estará comprendido en un intervalo de pesos moleculares medios de 500 Da a 50 000 Da, por ejemplo, de 5000 a 40 000 Da, tal como de 20 000 a 40 000 Da.

En un ejemplo, las moléculas efectoras adecuadas se pueden unir a través de cualquier cadena lateral de un aminoácido o grupo funcional de un aminoácido terminal disponible localizado en la proteína de fusión que es un anticuerpo, por ejemplo, cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Tales aminoácidos pueden existir de forma natural en el fragmento de anticuerpo o se pueden modificar en el fragmento utilizando métodos de ADN recombinante (remítase, por ejemplo, a US 5.219.996, US 5.667.425 y WO 98/25971).

La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la o las cadenas pesadas y/o ligeras de una molécula que es un anticuerpo de la presente invención. De forma adecuada, la secuencia de ADN codifica la cadena pesada o la cadena ligera de una molécula que es un anticuerpo de la presente invención. La secuencia de ADN de la presente invención puede comprender ADN sintético, por ejemplo, producido mediante procesamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de estos.

Las secuencias de ADN que codifican una molécula que es un anticuerpo de la presente invención se pueden obtener mediante métodos muy conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican parte o la totalidad de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo se pueden sintetizar según se desee a partir de las secuencias de ADN determinadas o en función de las secuencias de aminoácidos correspondientes.

El ADN que codifica las secuencias marco aceptoras se encuentra generalmente a la disposición de los expertos en la técnica y se puede sintetizar fácilmente en función de sus secuencias de aminoácidos conocidas.

Para preparar las secuencias de ADN que codifican la molécula que es un anticuerpo de la presente invención, se pueden utilizar técnicas estándar de biología molecular. Las secuencias de ADN deseadas se pueden sintetizar completamente o en parte utilizando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Se pueden utilizar técnicas de mutagénesis dirigida al sitio y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según convenga.

Se proporcionan ejemplos de secuencias adecuadas en la SEQ ID NO:21 de la Figura 5 (a), la SEQ ID NO:22 de la Figura 5(b), la SEQ ID NO:23 de la Figura 6(a) y la SEQ ID NO:24 de la Figura 6(b). Los nucleótidos 1-63 en la SEQ ID NO:21 y 1-63 en la SEQ ID NO:23 codifican la secuencia del péptido señal OmpA, que se escinde para obtener una molécula de fusión que es un anticuerpo antagonista de la presente invención. La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena pesada de una proteína de fusión que es un anticuerpo de la presente invención que comprende la SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:22. La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena ligera de una molécula de fusión que es un anticuerpo de la presente invención que comprende la SEQ ID NO:23 o SEQ ID NO:24.

Se proporcionan otros ejemplos de secuencias adecuadas en la SEQ ID NO:25 de la Figura 7(a), la SEQ ID NO:26 de la Figura 7(b), la SEQ ID NO:27 de la Figura 8(a) y la SEQ ID NO:28 de la Figura 6(b). Los nucleótidos 1-57 en la SEQ ID NO:25 y 1-60 en la SEQ ID NO:27 codifican la secuencia del péptido señal del anticuerpo de ratón B72.3 (Whittle *et al.*, 1987, *Protein Eng.* 1(6) 499-505), que se escinde para obtener una molécula de fusión que es un anticuerpo antagonista de la presente invención. La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena pesada de una proteína de fusión que es un anticuerpo de la presente invención que comprende la SEQ ID NO:25 o SEQ ID NO:26. La presente invención también

proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena ligera de una molécula de fusión que es un anticuerpo de la presente invención que comprende la SEQ ID NO:27 o SEQ ID NO:28.

La presente invención también se refiere a un vector de expresión o clonación que comprende una o más secuencias de ADN de la presente invención. Por consiguiente, se proporciona un vector de expresión o clonación que comprende una o más secuencias de ADN que codifican una proteína de fusión que es un anticuerpo de la presente invención. De forma adecuada, el vector de expresión o clonación comprende dos secuencias de ADN, las cuales codifican la cadena ligera y la cadena pesada de la molécula que es un anticuerpo de la presente invención, respectivamente. De forma adecuada, un vector de acuerdo con la presente invención comprende las secuencias que se proporcionan en la SEQ ID NO:21 y la SEQ ID NO:23. Los nucleótidos 1-63 en la SEQ ID NO:21 y 1-63 en la SEQ ID NO:23 codifican la secuencia del péptido señal de OmpA.

Los métodos generales mediante los cuales se pueden construir los vectores, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son de uso común para los expertos en la técnica. En este sentido, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, Nueva York y al "Maniatis Manual" producido por Cold Spring Harbor Publishing.

También se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores de expresión o clonación que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican una proteína de fusión que es un anticuerpo de la presente invención. Se puede utilizar cualquier sistema adecuado de célula huésped/vector para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula que es un anticuerpo de la presente invención. Se pueden utilizar sistemas bacterianos, por ejemplo, *E. coli* y otros sistemas microbianos, o también se pueden utilizar sistemas de expresión en células huésped eucariotas, por ejemplo, de mamífero. Las células huésped de mamífero adecuadas incluyen CHO, células de mieloma o células de hibridoma.

La presente invención también proporciona un proceso para producir una molécula de fusión que es un anticuerpo de acuerdo con la presente invención que comprende cultivar una célula huésped que contiene un vector de la presente invención en condiciones adecuadas para provocar la expresión de la proteína a partir del ADN que codifica la molécula que es un anticuerpo de la presente invención, y aislar la molécula que es un anticuerpo.

Para producir productos que comprenden las cadenas tanto pesada como ligera, la línea celular se puede transfectar con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. De manera alternativa, se puede utilizar un único vector, incluyendo el vector secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y cadena pesada.

Dado que las proteínas de fusión que son anticuerpos de la presente invención son útiles en el tratamiento y/o la profilaxis de una afección patológica, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende una molécula que es un anticuerpo de la presente invención combinada con uno o más de los siguientes: un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, se proporciona el uso de una proteína de fusión que es un anticuerpo de la invención para la elaboración de un medicamento. La composición se suministrará habitualmente como parte de una composición farmacéutica estéril que incluirá normalmente un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona un proceso para preparar una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende añadir y mezclar la molécula de fusión que es un anticuerpo de la presente invención junto con uno o más de los siguientes: un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

La molécula de fusión que es un anticuerpo puede ser el único principio activo en la composición farmacéutica o de diagnóstico, o puede ir

acompañada de otros principios activos, incluidos otros ingredientes que sean anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, anti-IL-1 β , anti-linfocitos T, anti-IFN γ o anti-LPS, o ingredientes que no sean anticuerpos tales como xantinas. Otros principios activos adecuados incluyen anticuerpos capaces de inducir tolerancia, por ejemplo, anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4.

En una realización adicional, la proteína de fusión que es un anticuerpo o la composición de acuerdo con la descripción se emplea combinada con un agente farmacéuticamente activo adicional, por ejemplo, un corticosteroide (tal como propionato de fluticasona) y/o un agonista beta-2 (tal como salbutamol, salmeterol o formoterol) o inhibidores del crecimiento y la proliferación celulares (tales como rapamicina, ciclofosfamida, metotrexato) o, como alternativa, un inhibidor de CD28 y/o CD40. En una realización, el inhibidor es una molécula de bajo peso molecular. En otra realización, el inhibidor es un anticuerpo específico para la diana.

Las composiciones farmacéuticas comprenden de forma adecuada una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión que es un anticuerpo de la invención. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se utiliza en la presente, se refiere a la cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección objetivo, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la cantidad terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente en ensayos de cultivos celulares o en modelos con animales, habitualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo con animales también se puede utilizar para determinar el intervalo de concentraciones y la vía de administración adecuados. Tal información se puede utilizar posteriormente para determinar las dosis y las vías de administración útiles en seres humanos.

La cantidad terapéuticamente eficaz exacta para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado patológico, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, la o las combinaciones de fármacos, las sensibilidades de reacción y la tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad se puede

determinar mediante experimentación rutinaria y se deja al criterio del médico. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz estará comprendida entre 0.01 mg/kg y 50 mg/kg, por ejemplo, entre 0.1 mg/kg y 20 mg/kg. Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar de forma conveniente en formas farmacéuticas unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.

Las composiciones se pueden administrar individualmente a un paciente o se pueden administrar combinadas (p. ej., de forma simultánea, secuencial o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas.

La dosis que se administra de la molécula de fusión que es un anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la afección que se ha de tratar, el grado de inflamación presente y de si la molécula que es un anticuerpo se está utilizando de forma profiláctica o para tratar una afección existente.

La frecuencia de la dosis dependerá de la semivida de la molécula de fusión que es un anticuerpo y de la duración de su efecto. Si la molécula que es un anticuerpo tiene una semivida corta (p. ej., de 2 a 10 horas), quizás sea necesario administrar una o más dosis por día. Como alternativa, si la molécula que es un anticuerpo tiene una semivida larga (p. ej., de 2 a 15 días), quizás solo sea necesario administrar una dosis una vez al día, una vez a la semana o incluso una vez cada 1 o 2 meses.

El portador farmacéuticamente aceptable no debería inducir por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y no debería ser tóxico. Los portadores adecuados pueden ser macromoléculas de gran tamaño que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.

Se pueden utilizar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y

sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

Los portadores farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, puede haber sustancias auxiliares presentes en estas composiciones, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias amortiguadoras del pH. Estos portadores hacen posible que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas y suspensiones, para que el paciente las ingiera.

Las formas de administración adecuadas incluyen formas adecuadas para administración parenteral, p. ej., por inyección o infusión, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. En los casos en los que el producto está destinado a inyección o infusión, puede adoptar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un portador acuoso u oleoso y puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, la molécula que es un anticuerpo puede estar en forma seca, para reconstituirla antes de su uso con un líquido estéril adecuado.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos que se han de tratar pueden ser animales. Sin embargo, en una o más realizaciones, las composiciones están adaptadas para la administración a sujetos humanos.

De forma adecuada, en las formulaciones de acuerdo con la presente descripción, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento, por ejemplo, si el pH de la formulación es 7 entonces puede ser adecuado un pl de 8-9 o superior. Sin pretender vincularse a ninguna teoría, se cree que esto puede proporcionar en última instancia una formulación final con estabilidad mejorada, por ejemplo, el anticuerpo o fragmento permanece en solución.

En un aspecto, de forma beneficiosa la molécula de fusión de la presente descripción no tiene un pl que corresponda a una molécula global neutra. Esto hace que la molécula sea menos propensa a agregarse.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar mediante cualquier número de vías, que incluyen, sin carácter limitante, la vía oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, remítase a WO 98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También se pueden utilizar hipoaerosoles para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Habitualmente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar como composiciones inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en portadores líquidos antes de la inyección.

El suministro directo de las composiciones se llevará a cabo en general mediante inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se suministrarán al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar a una lesión. El tratamiento de las dosis puede ser un programa de una única dosis o un programa de múltiples dosis.

Se debe tener en cuenta que el principio activo en la composición será una molécula que es un anticuerpo. Como tal, este será sensible a la degradación en el aparato digestivo. De este modo, si la composición se va a administrar mediante una vía que utilice el aparato digestivo, la composición deberá contener agentes que protejan al anticuerpo contra la degradación, pero que liberen el anticuerpo una vez que haya sido absorbido desde el aparato digestivo.

En *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Company, N.J. 1991) se puede consultar una exposición exhaustiva de portadores farmacéuticamente aceptables.

En una realización, la formulación se proporciona como una formulación para administraciones tópicas, incluida la inhalación.

Los preparados inhalables adecuados incluyen polvos inhalables, aerosoles dosificadores que contienen gases propelentes o soluciones inhalables exentas de gases propelentes. Los polvos inhalables de acuerdo con la descripción que contienen la sustancia activa pueden estar constituidos únicamente por las sustancias activas mencionadas anteriormente o por una mezcla de las sustancias activas mencionadas anteriormente con un excipiente fisiológicamente aceptable.

Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (p. ej., glucosa o arabinosa), disacáridos (p. ej., lactosa, sacarosa, maltosa), oligo- y polisacáridos (p. ej., dextranos), polialcoholes (p. ej., sorbitol, manitol, xilitol), sales (p. ej., cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de estos entre sí. Convenientemente se utilizan mono- o disacáridos, estando el uso de lactosa o glucosa particularmente pero no exclusivamente en forma de sus hidratos.

Las partículas para la deposición en el pulmón requieren un tamaño de partícula inferior a 10 micras, tal como de 1-9 micras, por ejemplo, de 0.1 a 5 μm , en particular de 1 a 5 μm . El tamaño de partícula del principio activo (tal como el anticuerpo o fragmento) tiene una importancia primordial.

Los gases propelentes que se pueden utilizar para preparar los aerosoles inhalables son conocidos en la técnica. Los gases propelentes adecuados se seleccionan entre hidrocarburos tales como *n*-propano, *n*-butano o isobutano y halohidrocarburos tales como derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propelentes mencionados anteriormente se pueden utilizar por sí solos o mezclas entre sí.

Los gases propelentes particularmente adecuados son los derivados halogenados de alcanos seleccionados entre TG 11, TG 12, TG 134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados mencionados anteriormente, son particularmente adecuados TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano), y sus mezclas.

Los aerosoles inhalables que contienen gases propelentes también pueden contener otros ingredientes tales como codisolventes, estabilizantes, agentes tensioactivos (surfactantes), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes son conocidos en la técnica.

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

Como alternativa, las administraciones tópicas al pulmón también se pueden realizar mediante la administración de una formulación en solución o suspensión líquida, por ejemplo, empleando un dispositivo tal como un nebulizador, por ejemplo, un nebulizador conectado a un compresor (p. ej., el nebulizador Pari LC-Jet Plus(R) conectado a un compresor Pari Master(R) fabricado por Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

La proteína de fusión que es un anticuerpo de la invención se puede suministrar dispersada en un disolvente, p. ej., en forma de una solución o una suspensión. Se puede suspender en una solución fisiológica adecuada, p. ej., una solución salina u otro disolvente farmacológicamente aceptable o una solución tamponada. Las soluciones tamponadas conocidas en la técnica pueden contener de 0.05 mg a 0.15 mg de edetato disódico, de 8.0 mg a 9.0 mg de NaCl, de 0.15 mg a 0.25 mg de polisorbato, de 0.25 mg a 0.30 mg de ácido cítrico anhidro, y de 0.45 mg a 0.55 mg de citrato de sodio por 1 ml de agua para conseguir un pH de aproximadamente 4.0-5.0. Una suspensión puede emplear, por ejemplo, un anticuerpo liofilizado.

Las formulaciones terapéuticas en suspensión o solución también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes son muy conocidos en la técnica e incluyen tampones (p. ej., tampón de citrato, tampón de fosfato, tampón de acetato y tampón de bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (p. ej., albúmina de suero), EDTA,

cloruro sódico, liposomas, manitol, sorbitol y glicerol. Las soluciones o suspensiones se pueden encapsular en liposomas o en microesferas biodegradables. La formulación se proporcionará generalmente en una forma sustancialmente estéril, empleando procesos de fabricación estériles.

Esto puede incluir la producción y esterilización por filtración de la solución/disolvente tamponado utilizado para la formulación, la suspensión aséptica del anticuerpo en la solución/disolvente tamponado estéril, y la dispensación de la formulación en receptáculos estériles mediante métodos con los cuales estarán familiarizados los expertos en la técnica.

La formulación nebulizable de acuerdo con la presente descripción se puede proporcionar, por ejemplo, como unidades de dosis individuales (p. ej., viales o recipientes de plástico cerrados herméticamente) envasadas en envoltorios de papel de aluminio. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen, p. ej., 2 mL, de disolvente/solución tamponado.

Las proteínas de fusión que son anticuerpos descritas en la presente pueden ser adecuadas para el suministro mediante nebulización.

También se contempla que el anticuerpo de la presente invención se pueda administrar mediante uso de terapia génica. Para conseguir esto, las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesada y ligera de la molécula que es un anticuerpo bajo el control de componentes de ADN adecuados se introducen en un paciente de forma que las cadenas del anticuerpo se expresen a partir de las secuencias de ADN y se acoplen *in situ*.

La presente invención también proporciona una molécula de fusión que es un anticuerpo (o composiciones que la comprenden) para su uso en el control de enfermedades inflamatorias, por ejemplo, una enfermedad inflamatoria aguda o crónica. De forma adecuada, la molécula que es un anticuerpo (o composiciones que la comprenden) se puede utilizar para reducir el proceso inflamatorio o para prevenir el proceso inflamatorio. En una realización, se proporciona una reducción *in vivo* de linfocitos T activados, en particular los implicados en respuestas inmunitarias inflamatorias inadecuadas, por ejemplo, que se dirigen hacia la proximidad/localización de tal respuesta.

La reducción de linfocitos T activados, tal como se utiliza en la presente, puede ser una reducción de un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 por ciento o superior en comparación con los linfocitos antes del tratamiento o sin tratamiento.

Convenientemente, el tratamiento con un anticuerpo, fragmento o composición de acuerdo con la presente invención puede permitir la reducción en el nivel de linfocitos T activados sin reducir el nivel general de linfocitos T (linfocitos T desactivados) del paciente. Esto puede dar como resultado menos efectos secundarios y posiblemente puede evitar la disminución de linfocitos T en el paciente.

La presente invención también proporciona la molécula de fusión que es un anticuerpo de la presente invención para su uso en el tratamiento o la profilaxis de un trastorno patológico que está mediado por OX40 o que está asociado con un incremento del nivel de OX40. La afección patológica se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo constituido por infecciones (víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias), choque endotóxico asociado con una infección, artritis, artritis reumatoide, asma, EPOC, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Peyronie, celiaquía, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad pilonidal, peritonitis, psoriasis, vasculitis, adhesiones quirúrgicas, apoplejía, diabetes de tipo I, enfermedad de Lyme, artritis, meningoencefalitis, uveitis autoinmunitaria, trastornos inflamatorios del sistema nervioso central y periférico mediados por el sistema inmunitario tales como esclerosis múltiple, lupus (tal como lupus eritematoso sistémico y nefritis lúpica) y síndrome de Guillain-Barré, dermatitis atópica, hepatitis autoinmunitaria, alveolitis fibrosante, enfermedad de Graves, nefropatía por IgA, púrpura idiopática trombocitopénica, enfermedad de Meniere, pénfigo, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, otros trastornos autoinmunitarios, pancreatitis, traumatismo (cirugía), enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplantes, cardiopatía, incluidas las enfermedades isquémicas tales como

infarto de miocardio, así como aterosclerosis, coagulación intravascular, resorción ósea, osteoporosis, osteoartritis, periodontitis e hipoclorhidria.

En una realización, la proteína de fusión que es un anticuerpo de acuerdo con la invención se utiliza en el tratamiento de alergia, EPOC, enfermedad autoinmunitaria, artritis reumatoide, asma, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, miastenia grave, enfermedad de Graves, rechazo de trasplantes, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schonlein, esclerosis sistémica o inflamación pulmonar inducida por virus.

En una realización, la proteína de fusión que es un anticuerpo de acuerdo con la invención se utiliza en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo constituido por alergia, EPOC, enfermedad autoinmunitaria, artritis reumatoide, asma, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, miastenia grave, enfermedad de Graves, rechazo de trasplantes, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schonlein, esclerosis sistémica e inflamación pulmonar inducida por virus.

La presente invención también proporciona una molécula de fusión que es un anticuerpo de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento o la profilaxis del dolor, en particular el dolor asociado con la inflamación.

En una realización, el mecanismo mediante el cual actúan las moléculas de fusión de la presente descripción incluye uno o más de los siguientes: inhibición de la proliferación o supervivencia de los linfocitos T, mejora de la generación de TReg, reducción de la diferenciación de linfocitos B y/o disminución de la producción de citocinas.

La presente invención proporciona además el uso de una molécula de fusión que es un anticuerpo o una composición de acuerdo con la presente invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la

profilaxis de un trastorno patológico que está mediado por OX40 o que está asociado con un incremento del nivel de OX40, en particular el trastorno patológico es artritis reumatoide, asma o EPOC.

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

Una molécula de fusión que es un anticuerpo o una composición de la presente invención se puede utilizar en cualquier terapia en la que se desee reducir los efectos de OX40 en el cuerpo humano o animal. OX40 puede estar circulando en el organismo o puede estar presente en un nivel indeseablemente elevado localizado en un sitio particular del organismo, por ejemplo, un sitio de inflamación.

En una realización, la molécula de fusión que es un anticuerpo de la presente invención, o una composición que la comprende, se utiliza para el control de la enfermedad inflamatoria, p. ej., según se describe en la presente.

La presente invención también proporciona un método para tratar sujetos humanos o animales que padecen o corren el riesgo de padecer un trastorno mediado por OX40, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de la molécula de fusión que es un anticuerpo de la presente invención o una composición que la comprende.

En una realización, se proporciona una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico purificada, la cual se une a OX40 humano y a albúmina de suero humano, en una forma sustancialmente purificada, en particular exenta o sustancialmente exenta de endotoxinas y/o proteínas o ADN de la célula huésped.

Se pretende que la expresión "forma purificada", tal como se utiliza anteriormente, se refiera a una pureza de al menos un 90%, tal como una pureza de un 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% p/p o superior.

Se pretende que la expresión "sustancialmente exenta de endotoxinas" se refiera en general a un contenido de endotoxinas de 1 EU por mg de producto de anticuerpo o inferior, tal como 0.5 o 0.1 EU por mg de producto.

Se pretende que la expresión "sustancialmente exenta de proteínas o ADN de la célula huésped" se refiera en general a un contenido de proteínas y/o ADN de la célula huésped de 400 µg por mg de producto de anticuerpo o inferior, tal como 100 µg por mg o inferior, en particular 20 µg por mg, según convenga.

La molécula de fusión que es un anticuerpo de la presente invención también se puede utilizar en la diagnosis, por ejemplo, en la diagnosis *in vivo* y la tomografía de estados patológicos que impliquen OX40.

Convenientemente, se cree que las moléculas de fusión de la presente son seguras para su administración a seres humanos con una dosis terapéutica adecuada, en particular debido a que no son superagonistas y que es poco probable que provoquen una cascada de citocinas.

El término "superagonista", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo que expande los linfocitos T en ausencia de la participación de TCR.

En una realización, A26 Fab-Fv reduce el índice de división, lo cual indica que hay menos células de la población disponibles para la división; este efecto está mediado presuntamente por las células NK que están expresando OX40. El índice de división representa el número medio de divisiones celulares que ha sufrido una célula en la población original e incluye las células no divididas.

El índice de proliferación refleja únicamente la proliferación de la población que responde y, en una realización, el efecto inhibidor de A26 Fab-Fv utilizando esta medida se reduce relativamente.

Se pretende que el término "que comprende", en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiera a "que incluye".

Cuando sea técnicamente adecuado, las realizaciones de la invención se pueden combinar.

En la presente, las realizaciones se describen de modo que comprendan ciertas características/elementos. La descripción también se extiende para separar las realizaciones constituidas o constituidas esencialmente por dichas características/elementos.

La presente invención se describe además a título ilustrativo solamente en los siguientes ejemplos, que se refieren a las Figuras adjuntas, donde:

EJEMPLOS

Figuras en detalle:

Figura 1: Una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de la presente invención, que se denomina Fab-dsFv.

Figura 2:

- a) Región V de la cadena ligera del anticuerpo A26 (SEQ ID NO:7).
- b) Región V de la cadena pesada del anticuerpo A26 (SEQ ID NO:8).
- 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) y CDRL3 (SEQ ID NO:6) del anticuerpo A26.
- d) Cadena ligera del componente Fab del anticuerpo A26 (SEQ ID NO:9).
- e) Cadena pesada del componente Fab del anticuerpo A26 (SEQ ID NO:10).

Figura 3:

- a) Cadena pesada del componente Fv anti-albúmina 645gH5 (SEQ ID NO:11).
- b) Cadena ligera del componente Fv anti-albúmina 645gL4 (SEQ ID NO:12).
- c) Conector 1 (SEQ ID NO:13).
- d) Conector 2 (SEQ ID NO:14).
- e) Cadena pesada de Fab-dsFv (SEQ ID NO:15).
- f) Cadena ligera de Fab-dsFv (SEQ ID NO:16).

Figura 4:

- a) Dominio variable de la cadena pesada 645g1 (SEQ ID NO:17).
- b) Dominio variable de la cadena ligera 645g1 (SEQ ID NO:18).

c) A26 Fab-dsFv 645gH1 (SEQ ID NO:19).

d) A26 Fab-dsFv 645gL1 (SEQ ID NO:20).

Figura 5:

a) ADN que codifica la cadena pesada de Fab-dsFv, incluido el líder OmpA (SEQ ID NO:21).

b) ADN que codifica la cadena pesada de Fab-dsFv sin el líder OmpA (SEQ ID NO:22).

Figura 6:

a) ADN que codifica la cadena ligera de Fab-dsFv, incluido el líder OmpA (SEQ ID NO:23).

b) ADN que codifica la cadena ligera de Fab-dsFv sin el líder OmpA (SEQ ID NO:24).

Figura 7:

a) ADN que codifica la cadena pesada de Fab-dsFv, incluido el líder B72.3 (SEQ ID NO:25).

b) ADN que codifica la cadena pesada de Fab-dsFv sin el líder B72.3 (SEQ ID NO:26).

Figura 8:

a) ADN que codifica la cadena ligera de Fab-dsFv, incluido el líder B72.3 (SEQ ID NO:27).

b) ADN que codifica la cadena ligera de Fab-dsFv sin el líder B72.3 (SEQ ID NO:28).

La Figura 9a muestra la unión de A26 Fab-dsFv marcado con AlexaFluor 488 a linfocitos T CD4⁺OX40⁺ humanos activados.

La Figura 9b muestra la unión para A26 Fab', A26 Fab-Fv y A26 Fab'-PEG en presencia de HSA al 5% en linfocitos T CD4⁺, OX40⁺ humanos activados.

La Figura 10a muestra el efecto de A26 Fab-dsFv sobre la producción de citocinas en PBMC expuestas a un extracto alergénico de *Dermatophagoides pteronyssinus*.

La Figura 10b muestra la capacidad de A26 Fab-dsFv para inhibir la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en un modelo con ratones Hu-NSG.

La Figura 11a muestra la inhibición de la unión de OX40L a linfocitos T CD4⁺ OX40⁺ activados humanos por parte de A26 Fab-dsFv.

La Figura 11b muestra la inhibición de la unión de OX40L a linfocitos T CD4⁺ OX40⁺ activados humanos por parte de A26 Fab', A26 Fab-dsFv, A26 Fab'-PEG y dos controles.

La Figura 12a muestra que A26 Fab-Fv inhibe la reacción de linfocitos mixtos (MLR) en seres humanos.

La Figura 12b muestra que A26 Fab-Fv inhibe la producción de IFN-gamma durante la MLR en seres humanos.

La Figura 13 muestra que A26 Fab-Fv reduce el porcentaje de linfocitos T (CD25⁺) CD4⁺ activados después de una reestimulación del antígeno secundario con un extracto alergénico de *Dermatophagoides pteronyssinus*.

La Figura 14 muestra que cuando Fab-Fv y Fab-PEG se administran antes de la transferencia celular, inhiben de forma dependiente de la dosis la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en el modelo Hu-NSG.

Manipulaciones del ADN y métodos generales

Se utilizaron cepas de *E. coli* competentes para las transformaciones y el desarrollo rutinario de los cultivos. Las enzimas de modificación y restricción de ADN se obtuvieron de Roche Diagnostics Ltd. y New England Biolabs. Las preparaciones de los plásmidos se llevaron a cabo utilizando los kits de purificación de plásmidos Maxi (QIAGEN, N.º de catálogo 12165). Las reacciones de secuenciación del ADN se llevaron a cabo utilizando el kit de secuenciación del terminador ABI Prism Big Dye (N.º de catálogo 4304149) y se realizaron en un secuenciador automatizado ABI 3100 (Applied Biosystems). Los datos se analizaron utilizando el programa Sequencher (Genecodes). Los oligonucleótidos se obtuvieron de Simga o Invitrogen. Los genes que codifican las secuencias iniciales de la región V se construyeron mediante una estrategia de síntesis automatizada con DNA2.0 y se modificaron para generar las versiones injertadas mediante mutagénesis dirigida a los oligonucleótidos. La

concentración de Fab-Fv se determinó mediante un método de HPLC basado en la Proteína G.

EJEMPLO 1

Generación y análisis de diferentes injertos de humanización de 645 en A26Fab-645dsFv

Hemos descrito previamente el formato del anticuerpo Fab-dsFv (Figura 1) (que se denomina en ocasiones en la presente simplemente Fab-Fv) y un anticuerpo anti-albúmina humanizado que se conoce como '645gH1gL1' en WO2010/035012. También hemos descrito previamente la generación de un anticuerpo anti-OX40 antagonista humanizado, conocido como 'A26', y un fragmento Fab' PEGilato de este en WO2010/096418. En la presente, describimos la generación de un nuevo injerto humanizado mejorado del anticuerpo '645' conocido como 645dsgH5gL4 y la generación de una molécula que es un anticuerpo Fab-dsFv, la cual incorpora el injerto en el componente Fv y las regiones variables de 'A26' en el componente Fab. Las regiones variables de A26 se muestran en la Figura 2a y b (SEQ ID NOs 7 y 8).

Las secuencias de las regiones variables y constantes de A26 combinadas se muestran en la Figura 2d y e (SEQ ID NOs 9 y 10).

Las secuencias de 645gH1 y gL1 se muestran en la Figura 4(a) y (b), SEQ ID NOs 17 y 18.

Cuando se utiliza el término Fab'-PEG o A26 Fab'-PEG, se refiere a A26 Fab-40K PEG' que se describe en WO2010/096418.

1.1. Construcción de los plásmidos conectores A26Fab-645dsFv(gH1gL1) y A26Fab-645dsFv(gH5gL4)G4S

La totalidad de la región codificante de la cadena ligera de A26Fab-645dsFv(gL1) (SEQ ID NO:20) se clonó en un vector de expresión de mamífero UCB bajo el control del promotor HCMV-MIE y la secuencia de poliA SV40E. La región variable de la cadena ligera de 645dsFv(gL1) (SEQ ID NO:18) se mutó para obtener 645dsFv(gL4) (SEQ ID NO:12) mediante un método de PCR de superposición. La totalidad de la región codificante de la cadena pesada de A26Fab-645dsFv(gH1) (SEQ ID NO:19) se clonó en un vector de expresión de

mamífero UCB bajo el control del promotor HCMV-MIE y la secuencia de poliA SV40E. La región variable de la cadena pesada de 645dsFv(gH1) (SEQ ID NO:17) se mutó para obtener 645dsFv(gH5) (SEQ ID NO:11) mediante un método de PCR de superposición. Los constructos se verificaron por secuenciación. Ambos constructos contenían el conector 3xG4S que se proporciona en la SEQ ID NO:14, Figura 3(d).

1.2 Expresión en mamíferos de A26Fab-645dsFv(gH1gL1) y A26Fab-645dsFv(gH5gL4)

Se transfectaron células HEK293 con los plásmidos de cadena pesada y ligera utilizando el reactivo de transfección 293fectin de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Resumiendo, se incubaron 25 µg del plásmido de cadena pesada y 25 µg del plásmido de cadena ligera con 100 µl de 293fectin y 1700 µl de medio Optipro durante 20 min a temp. amb. A continuación, la mezcla se añadió a 50×10^6 células HEK293 en 50 ml de suspensión y se incubó durante 6 días con agitación a 37 °C. Después de 6 días, el sobrenadante se recolectó por centrifugación a 1500xg durante 10 minutos para eliminar las células y a continuación se filtró con un filtro estéril de 0.22 µm.

1.3 Purificación con la Proteína G de A26Fab-645dsFv(gH1gL1) y A26Fab-645dsFv(gH5gL4)

Los sobrenadantes de ~50 ml filtrados con un filtro de 0.22 µm se concentraron hasta ~2 ml utilizando concentradores Amicon Ultra-15 con una membrana que tenía un corte de pesos moleculares de 10 kDa y se centrifugaron a 4000xg en un rotor basculante. Se aplicaron 1.8 ml de sobrenadante concentrado con un flujo de 1 ml/min a una columna Gammabind Plus Sepharose de 1 ml (GE Healthcare) equilibrada en fosfato 20 mM, NaCl 40 mM, pH 7.4. La columna se lavó con fosfato 20 mM, NaCl 40 mM, pH 7.4 y el material unido se eluyó con glicina 0.1 M/HCl, pH 2.7. Se recolectó el pico de elución y el pH se ajustó a un pH de ~7 con Tris 2 M/HCl, pH 8.5. La elución de pH ajustado se concentró, se sometió a diafiltración con fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4 utilizando concentradores Amicon Ultra-15 con una membrana

que tenía un corte de pesos moleculares de 10 kDa y se centrifugó a 4000xg en un rotor basculante, hasta que quedó un volumen final de ~0.3 ml.

1.4 Análisis de exclusión por tamaño de A26Fab-645dsFv(gH1gL1) y A26Fab-645dsFv(gH5gL4)

Las muestras purificadas con la Proteína G se analizaron mediante HPLC de exclusión por tamaño. Las muestras se separaron en una columna Superdex 200 10/300 GL Tricorn (GE Healthcare), que se realizó con un gradiente isocrático de PBS pH 7.4 con un flujo de 1 ml/min. La detección del pico fue a 280 nm y el peso molecular aparente se calculó por comparación con una curva estándar de proteínas de peso molecular conocido frente al volumen de elución. El hecho de cambiar el injerto de humanización de 645dsFv, gH1gL1 por gH5gL4, dio como resultado un incremento del porcentaje del monómero de A26Fab-645dsFv expresado desde un 59% hasta un 71%, un incremento de un 12%, sin ningún cambio en la estabilidad térmica de dsFv (no se muestran los datos) ni en la afinidad de unión de dsFv a HSA (no se muestran los datos).

Ejemplo 2

2.1 Cinética de BIAcore para A26 Fab-dsFv (645gH5gL4) que se une a OX40

En este ejemplo y todos los que le siguen, el A26 Fab-dsFv 645gH5gL4 tenía la secuencia de la cadena pesada que se proporciona en la SEQ ID NO:15 (Figura 3(e)) y la secuencia de la cadena ligera que se proporciona en la SEQ ID NO:16 (Figura 3(f)), es decir, la cadena pesada contenía el conector G4S, G4T, G4S que se proporciona en la SEQ ID NO:13, Figura 3(c).

Se llevó a cabo un BIA (análisis de interacción biomolecular) utilizando un BIAcore T200 (GE Healthcare). El reactivo Affinipure, el cual es un fragmento F(ab')₂ anti-IgG humana producido en cabra que es específico para el fragmento F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch), se inmovilizó en un chip sensor CM5 mediante una reacción química de acoplamiento de amina hasta un nivel de captura de ~5000 unidades de respuesta (RU). Se utilizó el tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7.4, NaCl 0.15 M, EDTA 3 mM, surfactante P20 al

0.05%, GE Healthcare) como el tampón de elución con una tasa de flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Se utilizó una inyección de 10 μL de A26 Fab' con una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o A26Fab-dsFv con una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para su captura por parte del F(ab')₂ anti-IgG humana inmovilizado. Se realizó una titulación de OX40 humano sobre el A26 capturado para varias concentraciones (desde 25 nM hasta 1.5625 nM) con una tasa de flujo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. La superficie se regeneró con una inyección de 2 x 10 μL de HCl 50 mM, seguida de una inyección de 5 μL de NaOH 5 mM con una tasa de flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Las curvas de unión con sustracción del fondo se analizaron utilizando el software T200evaluation (versión 1.0) siguiendo los procedimientos estándar. Los parámetros cinéticos se determinaron a partir del algoritmo de ajuste.

Muestra	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD (pM)
Fab'	2.18 $\pm$ 0.38 E+05	1.00 E-05	4.68 E-11	46.8
Fab-Fv	2.55 $\pm$ 0.35 E+05	1.04 E-05	4.12 E-11	41.2
Fab' PEG	2.33 $\pm$ 0.46 E+05	1.12 E-05	4.84 E-11	48.4

Media de 4 determinaciones

Tabla 1

2.2. Cinética de BIAcore para A26 Fab-dsFv (645gH5gL4) que se une a albúmina

Se llevó a cabo un BIA (análisis de interacción biomolecular) utilizando un BIAcore T200 (GE Healthcare). El reactivo Affinipure, el cual es un fragmento F(ab')₂ anti-IgG humana producido en cabra que es específico para el fragmento F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch), se inmovilizó en un chip sensor CM5 mediante una reacción química de acoplamiento de amina hasta un nivel de captura de $\approx$ 5000 unidades de respuesta (RU). Se utilizó el tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7.4, NaCl 0.15 M, EDTA 3 mM, surfactante P20 al 0.05%, GE Healthcare) como el tampón de elución con una tasa de flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Se utilizó una inyección de 10 μL de Fab-Fv con una concentración de 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para su captura por parte del F(ab')₂ anti-IgG humana inmovilizado. Se realizó una titulación de albúmina de suero humano (HSA), albúmina de

suero de ratón (MSA) y albúmina de suero de macaco cangrejero (CSA) sobre el Fab-Fv capturado para varias concentraciones (desde 50 nM hasta 6.25 nM) con una tasa de flujo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. La superficie se regeneró con una inyección de 2 x 10 μL de HCl 50 mM, seguida de una inyección de 5 μL de NaOH 5 mM con una tasa de flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Las curvas de unión con sustracción del fondo se analizaron utilizando el software T200evaluation (versión 1.0) siguiendo los procedimientos estándar. Los parámetros cinéticos se determinaron a partir del algoritmo de ajuste.

Tabla 2

Muestra	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD (nM)
HSA	5.84 E+04	1.63 E-04	2.93 E-09	2.93
MSA	8.86 E+04	3.68 E-04	4.16 E-09	4.16
CSA	7.1 E+04	1.89 E-04	2.66 E-09	2.66

Media de 3 determinaciones

2.3 Demostración de que A26 Fab-dsFv(645gH5gL4) se une a OX40 y a albúmina de forma simultánea

Se evaluó la unión simultánea de OX40 humano y albúmina de suero humano a A26 Fab-dsFv. El constructo de A26 Fab-dsFv se capturó en la superficie del chip sensor como se ha indicado en el método para la cinética de Biacore para la unión de A26 Fab-dsFv a albúmina. Se realizó una titulación de HAS 50nM, OX40 25nM o una solución mixta con una concentración final de HSA 50nM y OX40 25nM, por separado, sobre el A26 Fab-dsFv capturado. La respuesta de unión para la solución combinada de HSA/OX40 fue equivalente a la suma de las respuestas de las inyecciones independientes. Esto confirma que Fab-dsFv es capaz de unirse de forma simultánea tanto a OX40 humano como a HSA.

Tabla 3

Muestra	Analito	Unión (RU)
A26 Fab-Fv	hOX40	25
	HSA	9
	hOX40 + HSA	35 (34)

2.4 Afinidad basada en las células de A26 Fab-dsFv (645gH5gL4)

Métodos:

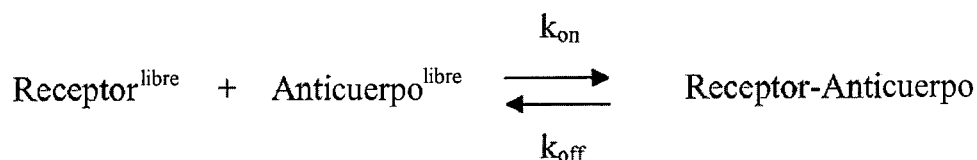
Unión de A26 Fab-Fv a linfocitos T CD4⁺OX40⁺ activados humanos

Se aislaron PBMC mediante una separación con un gradiente de Ficoll y se activaron con 4 µg/mL de PHA-L durante 3 días a 37 °C, con un 5% de CO₂ y un 100% de humedad. Se aislaron linfocitos T CD4⁺ mediante una selección

negativa utilizando microesferas magnéticas (kit de aislamiento de linfocitos T CD4⁺ II para seres humanos; Miltenyi Biotec). Se incubaron aproximadamente 1×10^5 células en presencia del anticuerpo en tampón Facs (PBS/BSA al 0.2%/NaN₃ al 0.09%) o en tampón Facs suplementado con HSA al 5% a 4 °C. La concentración final del anticuerpo estaba comprendida entre 48 nM y 0.0005 nM. Las células se lavaron en PBS antes del análisis por citometría de flujo utilizando un FACScalibur (Becton Dickinson). Se generaron dos grupos de datos de titulación en ambas condiciones tamponantes, uno con A26 Fab-dsFv y el segundo con un control irrelevante de Fab-Fv para determinar la unión no específica. El número de moles de anticuerpo unido se calculó utilizando valores interpolados a partir de una curva estándar generada utilizando microesferas comprimidas de cantidades diferentes pero conocidas de un tinte fluorescente. Se determinó la media geométrica de los valores de fluorescencia en los análisis de citometría de flujo de las células y las microesferas. La unión no específica se sustrajo de los valores de A26 Fab-dsFv y la curva de unión específica generada de este modo se analizó por regresión no lineal utilizando una ecuación de unión a un sitio (Graphpad Prism®) para determinar el valor de K_D .

Para determinar la afinidad de A26 Fab-dsFv por el antígeno expresado en la superficie celular, se realizaron experimentos de unión en condiciones de saturación utilizando linfocitos T CD4⁺OX40⁺ activados y A26 Fab-dsFv marcado con Alexa Fluor 488. Para determinar el valor de K_D , se utilizó la unión específica del anticuerpo al receptor en el punto de equilibrio para un intervalo de concentraciones del anticuerpo, asumiendo que solo una fracción muy pequeña del anticuerpo se unía al receptor en cualquier punto de la curva de unión.

La unión en el punto de equilibrio se describe utilizando la siguiente ecuación:



La tasa de asociación del anticuerpo con el receptor = $k_{\text{on}} \times [\text{Receptor}^{\text{libre}}] \times [\text{Anticuerpo}^{\text{libre}}]$.

La tasa de disociación del complejo receptor-anticuerpo = $k_{\text{off}} \times [\text{Receptor-Anticuerpo}]$.

En el punto de equilibrio, las tasas de asociación y disociación son iguales y se puede obtener una ecuación que describe la isoterma de unión; en una gráfica semi-log, la unión es sigmoideal. El valor de K_D se define mediante el cociente $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ y se puede calcular a partir de la curva de unión como la concentración para la cual tiene lugar una unión que es la mitad de la máxima.

La unión de A26 Fab-Fv marcado con AlexaFluor488 a linfocitos T $\text{CD4}^+\text{OX40}^+$ humanos activados se midió mediante citometría de flujo para un intervalo de concentraciones de 5-log.

En la Figura 9A se muestra una curva de unión representativa para A26 Fab-Fv.

El valor medio de K_D obtenido para células activadas de 5 donantes diferentes fue de 145 pM.

En la Figura 9B se muestra una curva de unión comparativa para A26 Fab, A26 Fab-Fv y A26 Fab-PEG.

Las gráficas representan la media de 4 o 5 experimentos, donde se utilizó un donante diferente para cada experimento.

Se aislaron PBMC mediante una separación con un gradiente de Ficoll y se activaron con 4 $\mu\text{g/mL}$ de PHA-L durante 3 días a 37 °C, con un 5% de CO_2 y un 100% de humedad. Después de esto, se aislaron linfocitos T CD4^+ mediante una selección negativa utilizando microesferas magnéticas (kit de aislamiento de linfocitos T CD4^+ II para seres humanos; Miltenyi Biotec). Se incubaron aproximadamente 1×10^5 células en presencia del anticuerpo en tampón Facs (PBS/BSA al 0.2%/NaN₃ al 0.09%) o en tampón Facs

suplementado con HSA al 5% a 4 °C. La concentración final del anticuerpo estaba comprendida entre 48 nM y 0.0005 nM. Las células se lavaron en PBS antes del análisis por citometría de flujo utilizando un FACScalibur (Becton Dickinson). También se generaron grupos de datos de titulación para los anticuerpos de control del isotipo para cada formato de A26 con el fin de determinar la unión no específica. El número de moles de anticuerpo unido se calculó utilizando valores interpolados a partir de una curva estándar generada a partir de microesferas comprimidas de cantidades diferentes pero conocidas de un tinte fluorescente. Se determinó la media geométrica de los valores de fluorescencia en los análisis de citometría de flujo de las células y las microesferas. La unión no específica se sustrajo de los valores de A26 Fab-Fv y la curva de unión específica generada de este modo se analizó por regresión no lineal utilizando una ecuación de unión a un sitio (Graphpad Prism®) para determinar el valor de K_D .

Tabla 4: Valores medios de K_D para anticuerpos A26 en ensayos de afinidad en células humanas

Formato del anticuerpo	Afinidad celular HSA	Afinidad celular SIN HSA
	K_D (nM) $\pm$ S.E.M	K_D (nM) $\pm$ S.E.M
A26 Fab-Fv (n=5)	0.145 $\pm$ 0.019	0.096 $\pm$ 0.017
A26 Fab'PEG (n=4)	0.230 $\pm$ 0.057	0.322 $\pm$ 0.089
A26 Fab' (n=4)	0.068 $\pm$ 0.011	0.085 $\pm$ 0.031

Ejemplo 3: A26 Fab-Fv modula la producción de citocinas de PBMC expuestas a un extracto alergénico de *Dermatophagoides pteronyssinus*

Se aislaron PBMC de voluntarios que padecían alergia mediante una separación con un gradiente de Ficoll. Las PBMC purificadas se expusieron a 25 μ g/mL de un extracto alergénico de *Dermatophagoides pteronyssinus* en presencia del anticuerpo de ensayo (intervalo de concentraciones: desde 50

µg/mL hasta 0.0005 µg/mL) en un volumen final de 200 µL por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Después de 6 días de incubación a 37 °C, con un 5% de CO₂ y un 100% de humedad, los sobrenadantes se recolectaron y se analizaron para determinar el contenido de IL-13 mediante MSD. La gráfica de la Figura 10(a) muestra datos representativos de un donante representativo de 4, donde la CE₅₀ media para la inhibición de la producción de IL-13 fue de 0.87 nM (intervalo desde 0.6 nM hasta 1.07 nM).

Tabla 5: Valores medios de CE₅₀ para anticuerpos A26 en ensayos *in vitro* para HDM en seres humanos

Los valores de CE₅₀ se calcularon a partir de curvas de inhibición de donantes individuales mediante regresión no lineal utilizando el software Graphpad Prism®

Formato del anticuerpo	Inhibición de la producción de IL-13 CE ₅₀ (nM) ± S.E.M	Inhibición de la producción de IL-5 CE ₅₀ (nM) ± S.E.M
A26 Fab-Fv (n=4)	0.865 ± 0.112	0.785 ± 0.216
A26 Fab'PEG (n=4)	0.928 ± 0.282	1.310 ± 0.425
A26 Fab' (n=4)	0.335 ± 0.040	0.680 ± 0.223

A26 Fab-Fv reduce el porcentaje de linfocitos T (CD25⁺) CD4⁺ activados después de una reestimulación del antígeno secundario con un extracto alergénico de *Dermatophagoides pteronyssinus*

Se estimularon *in vitro* linfocitos T CD4⁺ de donantes que padecían alergia durante 7 días con 25 µg/ml de un extracto alergénico de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Greer) y APC autólogo, sin ningún anticuerpo o en presencia de 10 µg/ml de A26 Fab'PEG, A26 Fab-Fv o Fab' de control (A33 Fab'). Las células se lavaron, se dejaron reposar durante 3 días y a continuación se volvieron a estimular con el extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus* del mismo modo que anteriormente (Figura 13). Después de 3 días, las células se lavaron y se tiñeron de forma fluorescente para determinar

CD3, CD4 y CD25 de superficie. A continuación, las células se analizaron mediante citometría de flujo con un citómetro de flujo FACS Canto (BD). Las células se seleccionaron en linfocitos vivos y para una expresión CD3⁺CD4⁺ antes del análisis. Los datos representan n = 3 donantes, incluida la media. n.s, A26 Fab-Fv comparado con Fab' de control (la significancia se midió utilizando una prueba t apareada de 2 colas).

Ejemplo 4: A26 Fab-Fv inhibe la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en un modelo con ratones Hu-NSG

Se administraron dosis s.c. de 0.03, 0.3, 3 o 30 mg/kg de A26 Fab-Fv a ratones un día antes de transferir 1×10^7 PBMC humanas en la cavidad peritoneal. Después de 14 días, los ratones se desangraron mediante una punción cardíaca con anestesia terminal y a continuación se sacrificaron mediante dislocación cervical. Posteriormente, se determinó el número de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ humanos en la sangre mediante un análisis FACS (Figura 10(b)). Los datos (n=10) se expresan como la media $\pm$ SEM y el análisis estadístico consiste en una ANOVA de una vía con una prueba posterior de Bonferroni. Los valores representan el % de inhibición $\pm$ SEM.

Los resultados se muestran en la Figura 14.

El modelo Hu-NSG ha demostrado que A26 Fab-Fv inhibe significativamente la proliferación de linfocitos T humanos *in vivo* e indica que A26 Fab-Fv es un candidato terapéutico viable para la inhibición de patologías mediadas por linfocitos T. Además, el formato de Fab-Fv confirió una mayor eficacia para dosis más bajas que el formato de Fab' PEG. La reducción de esta respuesta xenoproliferativa de los linfocitos T del donante puede proporcionar pruebas a favor de que A26 Fab-Fv podría ser un agente terapéutico viable para la enfermedad de injerto contra huésped (EICH).

Ejemplo 5: Capacidad para bloquear el ligando

La capacidad de A26 Fab-dsFv para bloquear la interacción entre OX40 expresado en la superficie celular y OX40L recombinante se evaluó utilizando un ensayo para bloquear el ligando basado en citometría de flujo. Resumiendo, se preincubaron linfocitos T CD4⁺OX40⁺ humanos activados con una titulación

de A26 Fab-Fv. Posteriormente, se añadió OX40L recombinante a las células y se permitió que se uniera en presencia de A26 Fab-dsFv. A continuación, la proporción de OX40L unido se detectó por citometría de flujo utilizando un reactivo secundario marcado. La Figura 11 muestra una curva de inhibición que representa los datos combinados de 3 donantes independientes y demuestra que A26 Fab-dsFv es capaz de bloquear completamente la unión de OX40L. La CI_{50} media para la inhibición de la unión de OX40L recombinante fue de 0.44 nM ($n = 3$ donantes).

Métodos: Inhibición de la unión de OX40L a linfocitos T $CD4^+OX40^+$ activados humanos por parte de A26 Fab-Fv

Se aislaron PBMC mediante una separación con un gradiente de Ficoll y se activaron con 4 $\mu\text{g/mL}$ de PHA-L (Sigma) durante 3 días a 37 °C, con un 5% de CO_2 y un 100% de humedad. A continuación, los linfocitos T $CD4^+$ se purificaron a partir del cultivo mediante una selección negativa utilizando columnas MACS (Miltenyi Biotech, kit de aislamiento de linfocitos T $CD4^+$ II). Se incubaron 2×10^5 linfocitos T $CD4^+$ en presencia de A26 Fab-dsFv (intervalo de concentraciones finales: 10 $\mu\text{g/mL}$ – 0.000056 $\mu\text{g/mL}$ (136.6 nM – 0.000765 nM)) durante 30 minutos a 4 °C. Se añadió OX40L (CD252 muCD8 biotinilado, Ancell) con una concentración final de 2 $\mu\text{g/mL}$ y se incubó durante 30 minutos más a 4 °C. Se lavaron las células y la unión de OX40L se detectó mediante la incubación con estreptavidina marcada con PE (Jackson ImmunoResearch) antes del análisis por citometría de flujo utilizando un FACS Canto (Becton Dickinson). Se utilizó un Fab-dsFv coincidente que no se unía a OX40 como control. La curva de inhibición se analizó por regresión no lineal (Graphpad Prism®) para determinar la CI_{50} . En la Figura 11 se muestra una curva de inhibición que representa los datos combinados de 3 donantes independientes, donde los puntos de evaluación representan la media y las barras de error representan la SEM.

La CE_{50} media para la inhibición de la unión de OX40L recombinante a OX40 por parte de A26 Fab-Fv fue de 0.445 nM. En comparación, A26 Fab'PEG fue ligeramente menos potente a la hora de bloquear el ligando (CE_{50}

= 0.739 nM), mientras que A26 Fab' presentó una potencia marginalmente mayor (CE_{50} = 0.242 nM) que Fab-Fv, según se muestra a continuación.

Tabla 6: Valores de CE_{50} para la inhibición de la unión de OX40L a linfocitos T $CD4^+OX40^+$ activados humanos por parte de anticuerpos A26

Formato del anticuerpo	CE_{50} para el bloqueo del ligando (nM) Media $\pm$ S.E.M.
A26 Fab-Fv ($n = 3$)	0.445 $\pm$ 0.110
A26 Fab'PEG ($n = 3$)	0.739 $\pm$ 0.166
A26 Fab' ($n = 3$)	0.242 $\pm$ 0.069

Los valores de CE_{50} se calcularon a partir de curvas de inhibición de donantes individuales mediante regresión no lineal utilizando el software Graphpad Prism®.

Ejemplo 6: Efecto de A26 Fab-Fv en ensayos humanos funcionales *in vitro*

Se evaluó el efecto de A26 Fab-Fv sobre interacciones celulares dependientes de OX40-OX40L en una serie de ensayos con linfocitos humanos dirigidos por antígenos. Estos ensayos se llevaron a cabo en presencia de suero humano al 5% para garantizar la saturación del sitio de unión a albúmina de la región Fv, que es lo que cabría esperar que sucediera *in vivo*.

A26 Fab-Fv inhibe la reacción de linfocitos mixtos

La reacción alogénica de linfocitos mixtos de una vía (MLR) es un modelo *in vitro* de proliferación y activación de linfocitos T alorreactivos (Bach *et al.*, 1964, O'Flaherty *et al.*, 2000). Los linfocitos T donantes se activan mediante el reconocimiento de antígenos MHC alogénicos en PBMC estimulantes donantes no relacionadas, lo cual da como resultado la proliferación celular y la producción de citocinas (Lukacs *et al.*, 1993). Se ha demostrado que la alorreacción de los linfocitos T está dirigida tanto por el antígeno MHC alogénico como por el péptido unido (Sherman *et al.*, 1993). La magnitud de una respuesta MLR se correlaciona con el grado de discrepancias en MHC entre el par estimulador-respondedor (Forrester *et al.*, 2004). Una respuesta MLR da como resultado la proliferación de células del donante

respondedor y la producción de citocinas derivadas de linfocitos T tanto Th1 (IL-2, IFN- γ y TNF- α) como Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13). Se cree que el perfil de citocinas exacto en una MLR es específico para el par estimulador-respondedor (Jordan *et al.*, 2002). Los ensayos MLR se han utilizado extensamente en investigación para estudiar vías de activación de linfocitos T, para cribar fármacos inmunosupresores y para predecir el posible rechazo de órganos del donante en receptores de trasplantes (Bromelow *et al.*, 2001).

Se investigó el efecto de A26 Fab-Fv sobre la activación y la proliferación de linfocitos T alorreactivos humanos *in vitro* utilizando un ensayo MLR esencialmente como el descrito por O'Flaherty *et al.*, 2000. Se cultivaron conjuntamente PBMC de dos donantes no relacionados en presencia o ausencia de A26 Fab-Fv, A26 Fab' o A26 Fab'PEG y se midió la proliferación celular mediante la incorporación de ^3H -timidina. Como se muestra en la Figura 12, A26 Fab-Fv inhibió la proliferación celular de un modo dependiente de la concentración con un valor de CE_{50} de 0.56 nM (40.9 ng/mL) y una inhibición máxima de un 55% ($n = 3$ apareamientos de donantes). A26 Fab-Fv fue ligeramente más potente que A26 Fab'PEG, el cual presentó un valor de CE_{50} de 0.88 nM, mientras que A26 Fab' presentó un valor de CE_{50} de 0.25 nM como se muestra en la Tabla 7.

Se aislaron PBMC humanas de dos donantes no relacionados a partir de la sangre entera. Las células de un donante se desactivaron por irradiación y para generar la población del estimulador. Las células del donante restante formaron la población del respondedor. Las poblaciones del estimulador y el respondedor se mezclaron con una proporción 1:1 (1×10^5 células/donante) y se cultivaron en presencia de A26 Fab', A26 Fab-Fv o A26 Fab'PEG (0.4 ng - 25 $\mu\text{g/mL}$) durante 6 días. Se utilizó el reactivo Fab-Fv CA162-01297.1 interno como un control de isotipo coincidente. La proliferación celular se midió el día 6 mediante la incorporación de ^3H -timidina (0.5 $\mu\text{Ci/pocillo}$). Los datos se muestran como el porcentaje de inhibición respecto al respondedor más la respuesta del estimulador en ausencia del reactivo biológico, y son los datos

combinados de tres apareamientos de donantes. Los valores de CE₅₀ se calcularon utilizando el software Graphpad Prism®.

Tabla 7: Valores de CE₅₀ para la inhibición de la respuesta proliferativa MLR en seres humanos por parte de anticuerpos A26

Formato del anticuerpo	CE ₅₀ (nM) Media ± S.E.M.
A26 Fab-Fv (n = 3)	0.56 ± 0.12
A26 Fab'PEG (n = 3)	0.88 ± 0.44
A26 Fab' (n = 3)	0.25 ± 0.06

Los sobrenadantes de la MLR de seres humanos también se analizaron para investigar el efecto de A26 Fab-Fv sobre la producción de citocinas. Según se muestra en la Figura 5.4, A26 Fab-Fv inhibió de forma significativa la producción de IFN-γ en MLR en una media de un 81% (n = 3 apareamientos de donantes).

Se aislaron PBMC humanas de dos donantes no relacionados a partir de la sangre entera. Las células de un donante se desactivaron por irradiación y para generar la población del estimulador. Las células del donante restante formaron la población del respondedor. Las poblaciones del estimulador y el respondedor se mezclaron con una proporción 1:1 (1x10⁵ células/donante) y se cultivaron en presencia de 25 µg/ml de A26 Fab', A26 Fab-Fv o A26 Fab'PEG o controles (A33 Fab' o CA162.01297.1) durante 6 días. Los sobrenadantes se recolectaron y se analizaron para determinar el contenido de IFN-γ utilizando un ensayo MSD. El porcentaje de inhibición se calculó con relación a las células cultivadas sin anticuerpo. Las gráficas representan los datos agrupados de tres donantes (media ± S.E.M). ** = p < 0.01; A26 Fab-Fv comparado con Fab-Fv de control (la significancia se midió utilizando una prueba t apareada de 2 colas).

Ejemplo 7: Unión de A26 Fab-Fv a células NK en una MLR de seres humanos

Se investigó el efecto de A26 Fab-Fv sobre la división de células NK en una MLR. La alorreacción de linfocitos T dirige la respuesta de linfocitos mixtos y A26 Fab-Fv inhibe significativamente la división de linfocitos T y la producción de IFN γ en este sistema. La inhibición de la división de células NK también podría contribuir a la reducción de la producción de IFN γ . Utilizando células respondedoras marcadas con CFSE, se demostró la inhibición de la división de células NK mediante el análisis FACS de la población que se estaba dividiendo (Figura 5.6). Se muestran dos medidas diferentes de la división celular. El índice de división representa el número medio de divisiones celulares que ha sufrido una célula en la población original e incluye las células no divididas; A26 Fab-Fv reduce el índice de división, lo cual indica que hay menos células de la población disponibles para la división; este efecto está mediado presuntamente por las células NK que están expresando OX40. El índice de proliferación refleja únicamente la proliferación de la población que responde y el efecto inhibitorio de A26 Fab-Fv utilizando esta medida se reduce relativamente.

Ejemplo 8: Valores medios de K_D / CE_{50} para A26 Fab-Fv en seres humanos en ensayos *in vitro*

Ensayo de unión / funcional	Valor medio de K_D / CE_{50} (nM) $\pm$ S.E.M.	Valor medio de K_D / CE_{50} (μ g/mL)
Afinidad ($n = 5$)	0.145 $\pm$ 0.019	0.011
Bloqueo de OX40L ($n = 3$)	0.445 $\pm$ 0.110	0.033
Reacción de linfocitos mixtos - Inhibición de la proliferación ($n = 3$)	0.558 $\pm$ 0.121	0.041
Ácaros del polvo doméstico - Inhibición de la producción de IL-13 ($n = 4$)	0.865 $\pm$ 0.112	0.063

Obviamente, se sobreentenderá que la presente invención se ha descrito únicamente a modo de ejemplo, no se pretende que sea limitante de ningún modo, y que se pueden realizar modificaciones de los detalles dentro

del alcance de las reivindicaciones que se exponen posteriormente en la presente. Las características preferidas de cada realización de la invención son como para cada una de las demás realizaciones *mutatis mutandis*. Todas las publicaciones, incluidas, sin carácter limitante, las patentes y solicitudes de patente, citadas en esta memoria descriptiva se incorporan a la presente por referencia como si se indicase que cada publicación individual se incorpora de forma específica e individual por referencia a la presente como si se hubiera expuesto de forma completa.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

1. Una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico, la cual se une a OX40 humano y a albúmina de suero humano, que comprende:

una cadena pesada que comprende, en secuencia desde el extremo N-terminal, un primer dominio variable de la cadena pesada (V_{H1}), un dominio $CH1$ y un segundo dominio variable de la cadena pesada (V_{H2}),

una cadena ligera que comprende, en secuencia desde el extremo N-terminal, un primer dominio variable de la cadena ligera (V_{L1}), un dominio CL y un segundo dominio variable de la cadena ligera (V_{L2}),

donde dichas cadenas ligera y pesada están alineadas de un modo tal que V_{H1} y V_{L1} forman un primer sitio de unión al antígeno y V_{H2} y V_{L2} forman un segundo sitio de unión al antígeno,

donde el antígeno que se une al primer sitio de unión al antígeno es OX40 humano y el antígeno que se une al segundo sitio de unión al antígeno es albúmina de suero humano,

donde el primer dominio variable de la cadena pesada (V_{H1}) comprende la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:1 para CDR-H1, la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:2 para CDR-H2 y la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:3 para CDR-H3 y el primer dominio variable de la cadena ligera (V_{L1}) comprende la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:4 para CDR-L1, la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:5 para CDR-L2 y la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:6 para CDR-L3,

donde el segundo dominio variable de la cadena pesada (V_{H2}) tiene la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:11 y el segundo dominio variable de la cadena ligera (V_{L2}) tiene la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO: 12 y

el segundo dominio variable de la cadena pesada (V_H2) y el segundo dominio variable de la cadena ligera (V_L2) están conectados mediante un enlace disulfuro.

2. Una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, la cual antagoniza la unión de OX40 a OX40L.

3. Una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la cual hay un conector peptídico entre el dominio CH1 y el segundo dominio variable de la cadena pesada (V_H2).

4. Una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la cual hay un conector peptídico entre el dominio CL y el segundo dominio variable de la cadena ligera (V_L1).

5. Una proteína de fusión que es un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el primer dominio variable de la cadena pesada (V_H1) comprende la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:8.

6. Una proteína de fusión que es un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el primer dominio variable de la cadena ligera (V_L1) comprende la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:7.

7. Una proteína de fusión que es un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la cadena pesada comprende o está constituida por la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:15.

8. Una proteína de fusión que es un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la cadena ligera comprende o está constituida por la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:16.

9. Una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico, la cual se une a OX40 humano y a albúmina de suero humano, que presenta una cadena pesada que comprende la secuencia que se proporciona en la SEQ ID

22

NO:15 y una cadena ligera que comprende la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:16.

10. Una secuencia de ADN aislada que codifica la o las cadenas pesadas y/o ligeras de una proteína de fusión que es un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

11. Un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN de acuerdo con la reivindicación 10.

12. Un vector de acuerdo con la reivindicación 11, donde el vector comprende las secuencias que se proporcionan en la SEQ ID NO:22 y la SEQ ID NO:24.

13. Una célula huésped que comprende uno o más vectores de clonación o expresión de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12.

14. Un proceso para producir la proteína de fusión que es un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 13 y aislar la proteína de fusión que es un anticuerpo.

15. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, combinada con uno o más de los siguientes: un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

16. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende adicionalmente otros principios activos.

17. Una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15 o la reivindicación 16, para su uso en terapia.

18. Una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15 o la reivindicación 16, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de un trastorno patológico que está mediado por OX40 o que está asociado con un incremento del nivel de OX40.

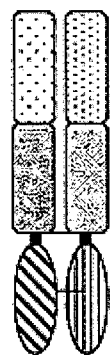
19. El uso de una proteína de fusión que es un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno patológico que está mediado por OX40 o que está asociado con un incremento del nivel de OX40.

20. El uso de acuerdo con la reivindicación 18 o la reivindicación 19, donde el trastorno patológico es una enfermedad seleccionada del grupo constituido por alergia, EPOC, enfermedad autoinmunitaria, artritis reumatoide, asma, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, miastenia grave, enfermedad de Graves, rechazo de trasplantes, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schonlein, esclerosis sistémica e inflamación pulmonar inducida por virus.

RESUMEN

La invención se refiere a moléculas que son anticuerpos con especificidad por determinantes antigénicos de OX40 humano, a usos terapéuticos de las moléculas que son anticuerpos y a métodos para producir dichas moléculas que son anticuerpos.

Figura 1



Primera región variable de la cadena ligera VL1

Primera región variable de la cadena pesada VH1

Regiones constantes cKappa y CH1

Segunda región variable de la cadena ligera VL2

Segunda región variable de la cadena pesada VH2

Enlace disulfuro



Figura 2

(a) Región variable de la cadena ligera del anticuerpo

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRF
SASGSGTDSTLTISSLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKR

(b) Región variable de la cadena pesada del anticuerpo

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYIRD
SVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTLVTVSS

(c)

- CDRH1: NYGIH (SEQ ID NO:1)
- CDRH2: SISPSGGLTYIRDSVKG (SEQ ID NO:2)
- CDRH3: GGEGIFDY (SEQ ID NO:3)
- CDRL1: RATQSIYNALA (SEQ ID NO:4)
- CDRL2: NANTLHT (SEQ ID NO:5)
- CDRL3: QQYYDYPLT (SEQ ID NO:6)

(d) Cadena ligera del componente Fab del anticuerpo anti-OX40 (SEQ ID NO:9)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRF
SASGSGTDSTLTISSLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(e) Cadena pesada del componente Fab del anticuerpo anti-OX40 (SEQ ID NO:10)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYIRD
SVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

Figura 3**(a) Cadena pesada del componente Fv anti-albúmina
(SEQ ID NO:11)**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDNISK
NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTILVTVSS

**(b) Cadena ligera del componente Fv anti-albúmina
(SEQ ID NO:12)**

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGCGTKVEIKRT

(c) Conector 1 (SEQ ID NO:13)

SGGGGSGGGGTGGGGG

(d) Conector 2 (SEQ ID NO:14)

GGGGSGGGGSGGGG

**(e) Cadena pesada de A26 Fab-(G4S, G4T, G4s)-645dsFv(gH5)
(SEQ ID NO:15)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYRDSVKGRFTISRDDA
KNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCSGGGG
SGGGGTGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAK
GRFTISRDNISKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTILVTVSS

**(f) Cadena ligera de A26 Fab-(3xG4s)-645dsFv(gL4)
(SEQ ID NO:16)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGTDSTLT
SSLQPEDFATYYCQYYDYPLTFGGGTVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSG
GGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGCGTKVEIKRT

Figura 4**(a) Dominio variable de la cadena pesada 645gH1****(SEQ ID NO:17)**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRSTT
VYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLLTVSS

(b) Dominio variable de la cadena ligera 645gL1**(SEQ ID NO:18)**

DIVMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFKSGSGTDFTLT
ISSLPEDFATYYCGGYSISDITTFGCGTKVEIK

(c) Cadena pesada de A26 Fab-(3xG4S)-645dsFv(gH1)**(SEQ ID NO:19)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYRDSVKGRFTISRDDA
KNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCSGGGG
SGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAK
GRFTISRSTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLLTVSS

(d) Cadena ligera de A26 Fab-(3xG4S)-645dsFv(gL1)**(SEQ ID NO:20)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGTDSTLTI
SSLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSGGGGSGGGGS
GGGSDIVMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFKSGSGT
DFTLTISSLPEDFATYYCGGYSISDITTFGCGTKVEIK

Figura 5

a) ADN que codifica la cadena pesada de A26-645(gH5) incluido el líder OmpA de *E. Coli* (SEQ ID NO:21)

```

ATGAAGAAGACTGCTATAGCGATCGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTCGCCACCGTGGCGCAAGCTGAAGTTCAGCTG
GTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTC
ACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTCAGGCACCAGGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCT
GGTGGTCTGACGTACTACCGTGA CTCTGTCAAAGSTCGTTTTACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCG
TACCTGCAAATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATAACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTC
GACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACAAAGGGCCCAAGCGTTTTCCCACTGGCT
CCGTCCTCTAAATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTTGCCTGGTGAAAGACTACTTCCCAGAACCAGTT
ACCGTGTCTTGGAACTCTGGTGCCTGACCTCTGGTGTTCACACCTTTCCAGCAGTTCTCCAGTCTTCTGGTCTG
TACTCCCTGTCTAGCGTGGTTACCGTTCGGTCTTCTTCTCTGGGTACTCAGACCTACATCTGCAACGTCAACCAC
AAACCGTCCAACACCAAGGTTCGACAAAAAAGTCGAGCCGAAATCCTGTAGTGGAGGTGGGGGCTCAGGTGGAGGC
GGGACCGGTGGAGGTGGCAGCGAGGTTCAACTGCTTGAGTCTGGAGGAGGCCTAGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTG
CGTCTCTCTTGTGCAGTAAGCGGCATCGACCTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAAGCTCCGGGGAAG
TGTTTAGAATGGATCGGTATAATATGGGCCAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAAGGAAGGTTTACA
ATTAGCCGGGACAATAGCAAAAACACCGTGTATCTCCAAATGAACTCCTTGCGAGCAGAGGACACGGCGGTGTAC
TATTGTGCTCGCACTGTCCCAGGTTATAGCACTGCACCCTACTTCGATCTGTGGGGACAAGGGACCCTGGTGACT
GTTTCAAGTTAA

```

b) ADN que codifica la cadena pesada de A26-645(gH5) (SEQ ID NO:22)

```

GAAGTTCAGCTGGTTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGCAAGC
GGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTCAGGCACCAGGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCT
ATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTACTACCGTGA CTCTGTCAAAGSTCGTTTTACCATCTCTCGTGATGACGCG
AAAACTCTCCGTACCTGCAAATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATAACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGT
GAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACAAAGGGCCCAAGCGTT
TTCCCACTGGCTCCGTCCTCTAAATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTTGCCTGGTGAAAGACTACTTC
CCAGAACCAGTTACCGTGTCTTGGAACTCTGGTGCCTGACCTCTGGTGTTCACACCTTTCCAGCAGTTCTCCAG
TCTTCTGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGTTACCGTTCGGTCTTCTTCTCTGGGTACTCAGACCTACATCTGC
AACGTCAACCACAAACCGTCCAACACCAAGGTTCGACAAAAAAGTCGAGCCGAAATCCTGTAGTGGAGGTGGGGGC
TCAGGTGGAGGCGGGACCGGTGGAGGTGGCAGCGAGGTTCAACTGCTTGAGTCTGGAGGAGGCCTAGTCCAGCCT
GGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGTAAGCGGCATCGACCTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAA
GCTCCGGGGAAGTGTTTAGAATGGATCGGTATAATATGGGCCAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAA
GGAAGGTTTACAATTAGCCGGGACAATAGCAAAAACACCGTGTATCTCCAAATGAACTCCTTGCGAGCAGAGGAC
ACGGCGGTGTACTATTGTGCTCGCACTGTCCCAGGTTATAGCACTGCACCCTACTTCGATCTGTGGGGACAAGGG
ACCCTGGTGACTGTTTCAAGTTAA

```

Figura 6**a) ADN que codifica la cadena ligera de A26-645(gL4) incluido el líder OmpA de *E. Coli* (SEQ ID NO:23)**

ATGAAAAAGACAGCTATCGCAATTGCAGTGGCGTTGGCTGGTTTCGCGACCGTTGCGCAAGCTGATATCCAGATG
ACCCAGAGCCCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTCTGCAACCCAGAGCATC
TACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAACGCGAACACTCTG
CATACTGGTGTTCGGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTCCAG
CCGGAAGATTTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTT
GAGATCAAACGTACGGTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACAGCTCAAATCTGGTACT
GCTTCTGTCTGCTTTCGCTCTGAAACAACCTTCTATCCGCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAAGTTCGACAACGCACTC
CAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCTCTGTCTAGCACCCCTG
ACTCTGTCCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTGTACGCTTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGAGCTCTCCG
GTTACCAAATCCTTTAATAGAGGGGAGTGTGGTGGCGGTGGCAGTGGTGGTGGAGGTTCCGGAGGTGGCGGTTCA
GACATACAAATGACCCAGAGTCTTTCATCGGTATCCGCGTCCGTTGGCGATAGGGTGACTATTACATGTCAAAGC
TCTCCTAGCGTCTGGAGCAATTTTCTATCCTGGTATCAACAGAAACCGGGGAAGGCTCCAAAACCTCTGATTTAT
GAAGCCTCGAAACTCACCAGTGGAGTTCCGTCAAGATTCAGTGGCTCTGGATCAGGGACAGACTTCACGTTGACA
ATCAGTTTCGCTGCAACCAGAGGACTTTGCGACCTACTATTGTGGTGGAGGTTACAGTAGCATAAGTGATACGACA
TTTGGGTGCGGTACTAAGGTGGAATCAAACGTACCTAA

b) ADN que codifica la cadena ligera de A26-645(gL4) (SEQ ID NO:24)

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTCTGCA
ACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAAC
CGCAACACTCTGCATACTGGTGTTCGGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATC
TCCTCTCTCCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGT
GGTACCAAAGTTGAGATCAAACGTACGGTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACAGCTC
AAATCTGGTACTGCTTCTGTCTGCTTTCGCTCTGAAACAACCTTCTATCCGCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAAGTC
GACAACGCACTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCTCTG
TCTAGCACCCCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTGTACGCTTGCGAAGTTACCCATCAGGGT
CTGAGCTCTCCGGTTACCAAATCCTTTAATAGAGGGGAGTGTGGTGGCGGTGGCAGTGGTGGTGGAGGTTCCGGA
GGTGGCGGTTTCAGACATACAAATGACCCAGAGTCTTTCATCGGTATCCGCGTCCGTTGGCGATAGGGTGACTATT
ACATGTCAAAGCTCTCCTAGCGTCTGGAGCAATTTTCTATCCTGGTATCAACAGAAACCGGGGAAGGCTCCAAAA
CTTCTGATTTATGAAAGCCTCGAAACTCACCAGTGGAGTTCCGTCAAGATTCAGTGGCTCTGGATCAGGGACAGAC
TTCACGTTGACAATCAGTTTCGCTGCAACCAGAGGACTTTGCGACCTACTATTGTGGTGGAGGTTACAGTAGCATA
AGTGATACGACATTTGGGTGCGGTACTAAGGTGGAATCAAACGTACCTAA

Figura 7**a) ADN que codifica la cadena pesada de A26-645(gH5) incluida la secuencia líder B72.3 (SEQ ID NO:25)**

ATGGAATGGTCCTGGGTCTTCCTGTTTTTCCTTTCTGTCAACAACGGGGTGCACAGCGAGGTGCAGCTCGTCGAG
TCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAAC
TACGGTATCCACTGGATTGCTCAGGCACCAGGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGT
CTGACGTACTACCGTGACTCTGTCAAAGGTGCTTTACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCGTACCTG
CAGATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATAACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTAC
TGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCAAGCGCTTCTACAAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCC
TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG
TCGTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC
AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAATCTTGTTCGGGAGGTGGCGGTTCGGGAGGTGGCGGTACC
GGTGGCGGTGGATCCGAAGTCCAGCTGCTTGAATCCGGAGGCGGACTCGTGCAGCCCCGAGGCAGTCTTCGCTTG
TCCTGCGCTGTATCTGGAATCGACCTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAGGCACCTGGGAAATGCCTC
GAATGGATCGGCATTATATGGGCTAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAGGGTAGATTCACAATCTCA
CGGGATAATAGTAAGAACACAGTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGAGCAGAGGATAACCGCCGTTTACTATTGT
GCTCGCACTGTCCAGGTTATAGCACTGCACCCCTACTTTGATCTGTGGGGGCAGGGCACTCTGGTCAACCGTCTCG
AGTTGA

b) ADN que codifica la cadena pesada de A26-645(gH5) (SEQ ID NO:26)

GAGGTGCAGCTCGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGCAAGC
GGTTTCACGTTACCAACTACCGTATCCACTGGATTGCTCAGGCACCAGGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCT
ATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTACTACCGTGACTCTGTCAAAGGTGCTTTACCATCTCTCGTGATGACGCG
AAAACTCTCCGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATAACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGT
GAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCAAGCGCTTCTACAAAGGGCCCATCGGTC
TTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAG
TCCTCTGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAATCTTGTTCGGGAGGTGGCGGT
TCCGGAGGTGGCGGTACCGGTGGCGGTGGATCCGAAGTCCAGCTGCTTGAATCCGGAGGCGGACTCGTGCAGCCC
GGAGGCAGTCTTCGCTTGTCTGCGCTGTATCTGGAATCGACCTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAG
GCACCTGGGAAATGCCTCGAATGGATCGGCATTATATGGGCTAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAG
GGTAGATTCACAATCTACGGGATAATAGTAAGAACACAGTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGAGCAGAGGAT
ACCGCCGTTTACTATTGTGCTCGCACTGTCCAGGTTATAGCACTGCACCCCTACTTTGATCTGTGGGGGCAGGGC
ACTCTGGTCAACCGTCTCGAGTTGA

Figura 8

a) ADN que codifica la cadena ligera de A26-645(gL4) incluida la secuencia líder B72.3 (SEQ ID NO:27)

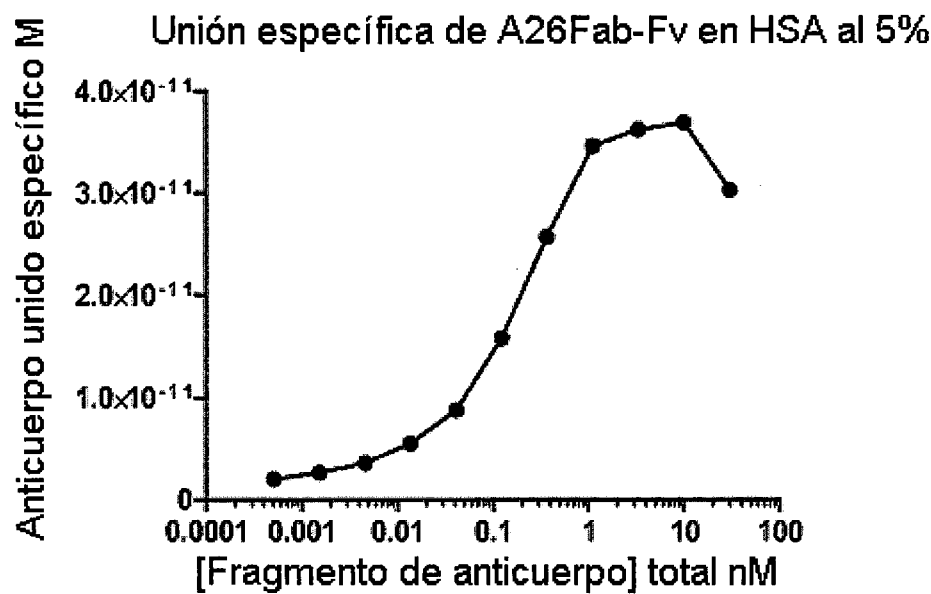
ATGTCAGTTCCACACAGGTGCTGGGCCTGCTTCTGTTGTGGCTCACCGATGCTAGGTGTGATATCCAGATGACC
 CAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTCTGCAACCCAGAGCATCTAC
 AACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCAT
 ACCGGTGTTCGGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCG
 GAAGATTTGCGGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAG
 ATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCCCATCTGATGAGCAGTTGAAGTCTGGCACTGCC
 TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCTAGAGAGGCCAAAGTCCAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTTCAA
 TCCGGAAACTCCCAGGAGAGTGTCACTGAGCAGGACTCAAAGGACTCCACCTATAGCCTTAGCAGCACACTGACA
 CTGAGCAAGGCTGACTACGAGAAACACAAGGTCTACGCCTGCGAAGTGACACATCAAGGCCTGAGCTCACCCGTG
 ACAAGAGCTTTAACAGGGGAGAGTGTGGTGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGTGGCTCCGGAGGCGGAGGAAGCGAC
 ATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCTCTGTAAGCGCCAGTGTCTGGAGACAGAGTACTATTACCTGCCAAAGCTCC
 CCTTCAGTCTGGTCCAATTTTCTATCCTGGTACCAGCAAAAGCCCGGAAAGGCTCCTAAATTGCTGATCTACGAA
 GCAAGCAAACTCACCAGCGGCGTGCCAGCAGGTTTACGCGGAGTGGGTCTGGAAGTACTTTTACCCTGACAATC
 TCCTCACTCCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTATTACTGCGGTGGAGGTTACAGTAGCATAAGTGATACGACATTT
 GGATGCGGCACTAAAGTGGAATCAAGCGTACCTGA

b) ADN que codifica la cadena ligera de A26-645(gL4) (SEQ ID NO:28)

GATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTCTGTGCA
 ACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCCTGATCTACAAC
 GCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCGGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATC
 TCCTCTCTGCAGCCGGAAGATTTGCGGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGT
 GGTACCAAAGTTGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCCCATCTGATGAGCAGTTG
 AAGTCTGGCACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCTAGAGAGGCCAAAGTCCAGTGGAAGGTG
 GATAACGCCCTTCAATCCGGAAACTCCCAGGAGAGTGTCACTGAGCAGGACTCAAAGGACTCCACCTATAGCCTT
 AGCAGCACACTGACACTGAGCAAGGCTGACTACGAGAAACACAAGGTCTACGCCTGCGAAGTGACACATCAAGGC
 CTGAGCTCACCCGTGACAAAGAGCTTTAACAGGGGAGAGTGTGGTGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGTGGCTCCGGA
 GGCGGAGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCTCTGTAAGCGCCAGTGTCTGGAGACAGAGTACTATT
 ACCTGCCAAAGCTCCCTTCAGTCTGGTCCAATTTTCTATCCTGGTACCAGCAAAAGCCCGGAAAGGCTCCTAAA
 TTGCTGATCTACGAAGCAAGCAAACTCACCAGCGGCGTGCCAGCAGGTTTACGCGGAGTGGGTCTGGAAGTACT
 TTTACCCTGACAATCTCCTCACTCCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTATTACTGCGGTGGAGGTTACAGTAGCATA
 AGTGATACGACATTTGGATGCGGCACTAAAGTGGAATCAAGCGTACCTGA

Figura 9

A



B

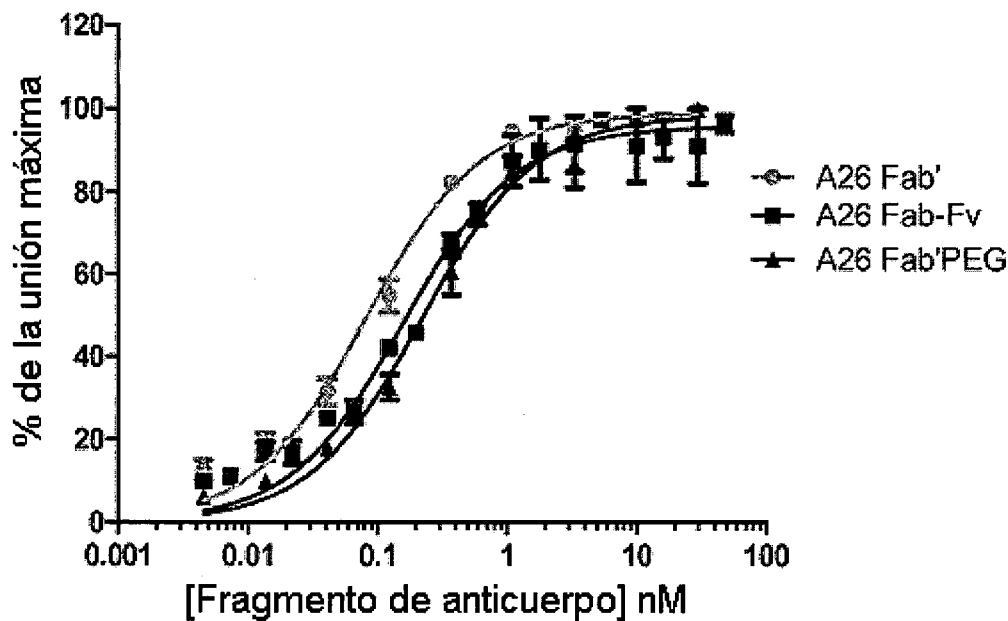
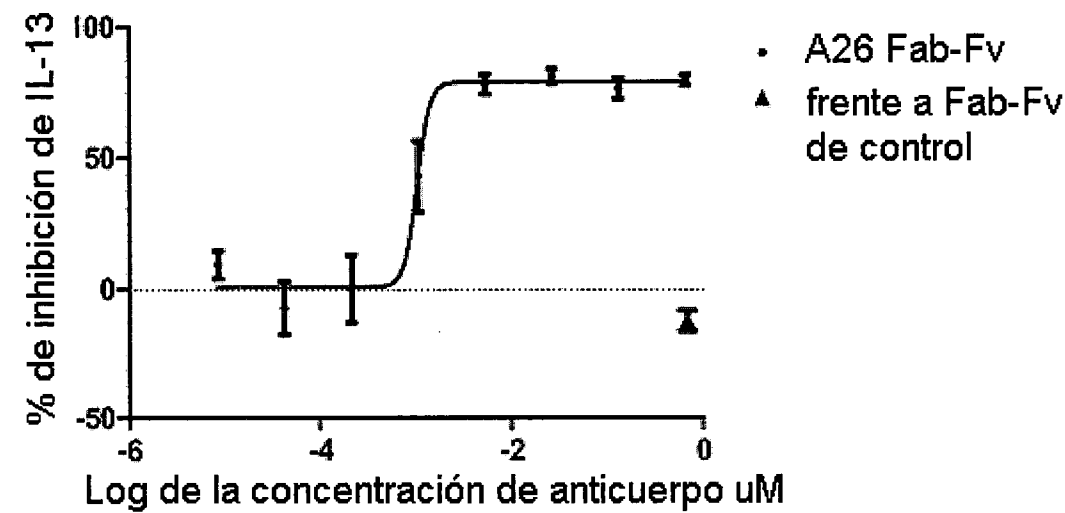


Figura 10

(a)



(b)

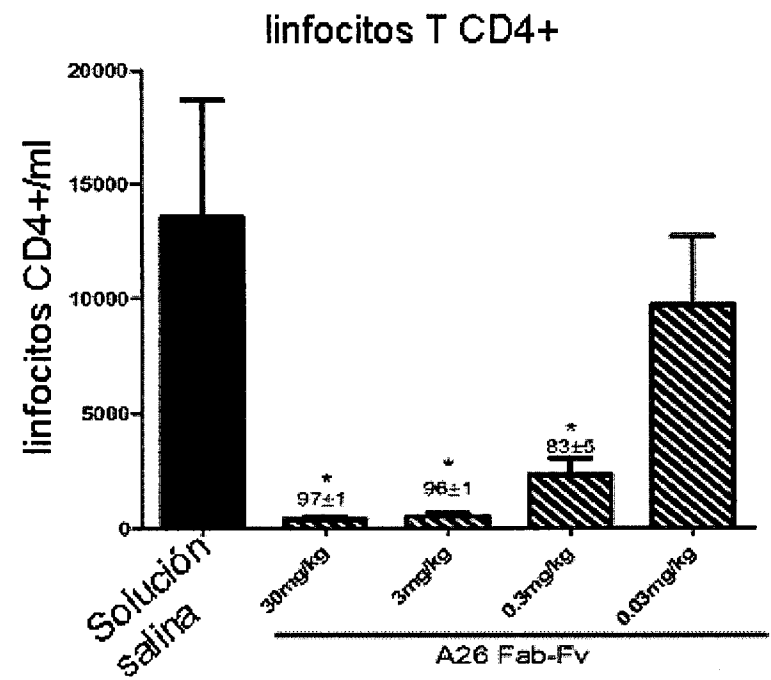
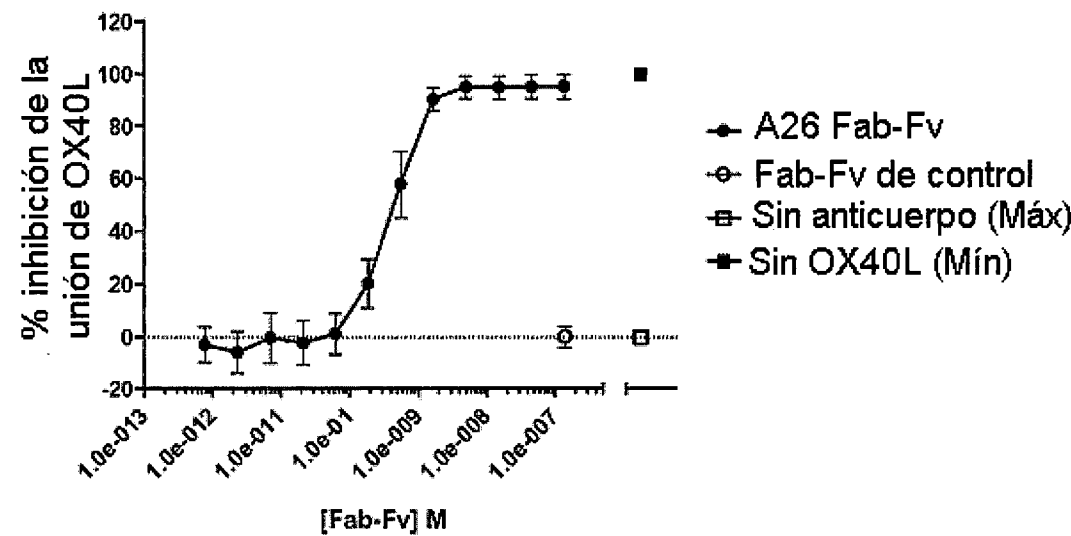


Figura 11
A

Inhibición de la unión de OX40L a linfocitos T
CD4⁺OX40⁺ activados humanos por parte de A26 Fab-Fv



B

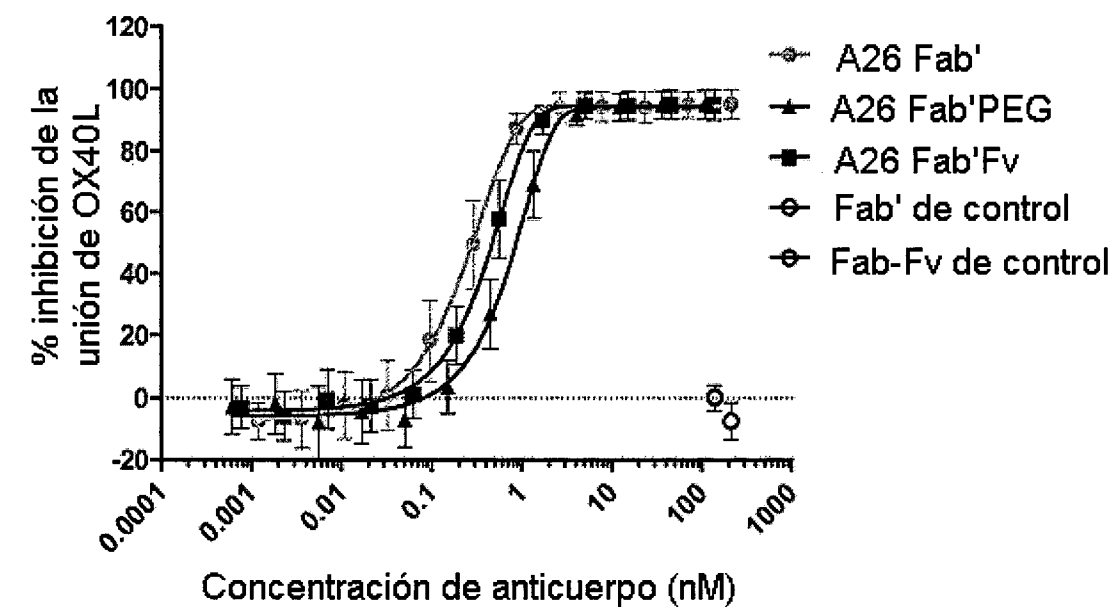
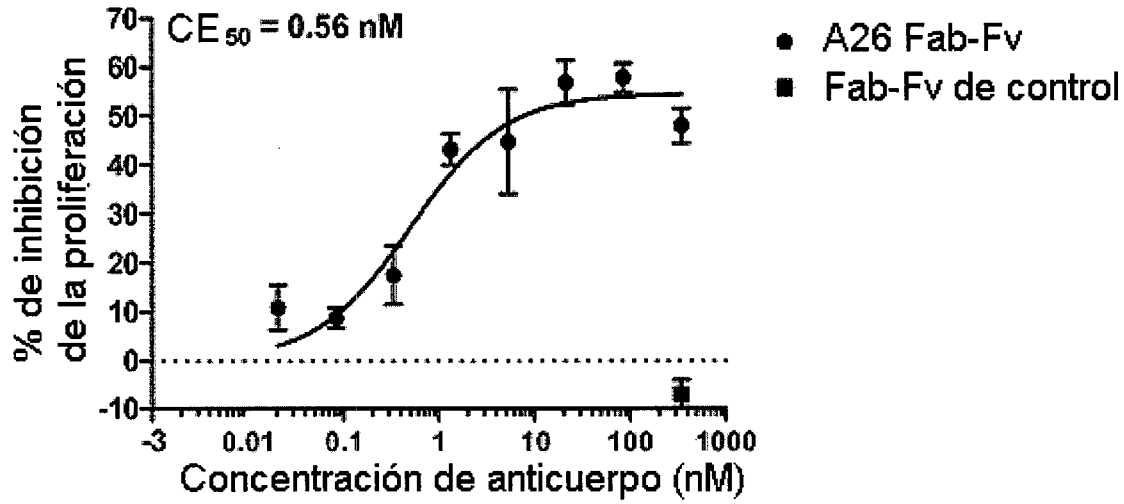


Figura 12

A A26 Fab-Fv inhibe la reacción de linfocitos mixtos en seres humanos



B A26 Fab-Fv inhibe la producción de IFN- γ durante la MLR en seres humanos

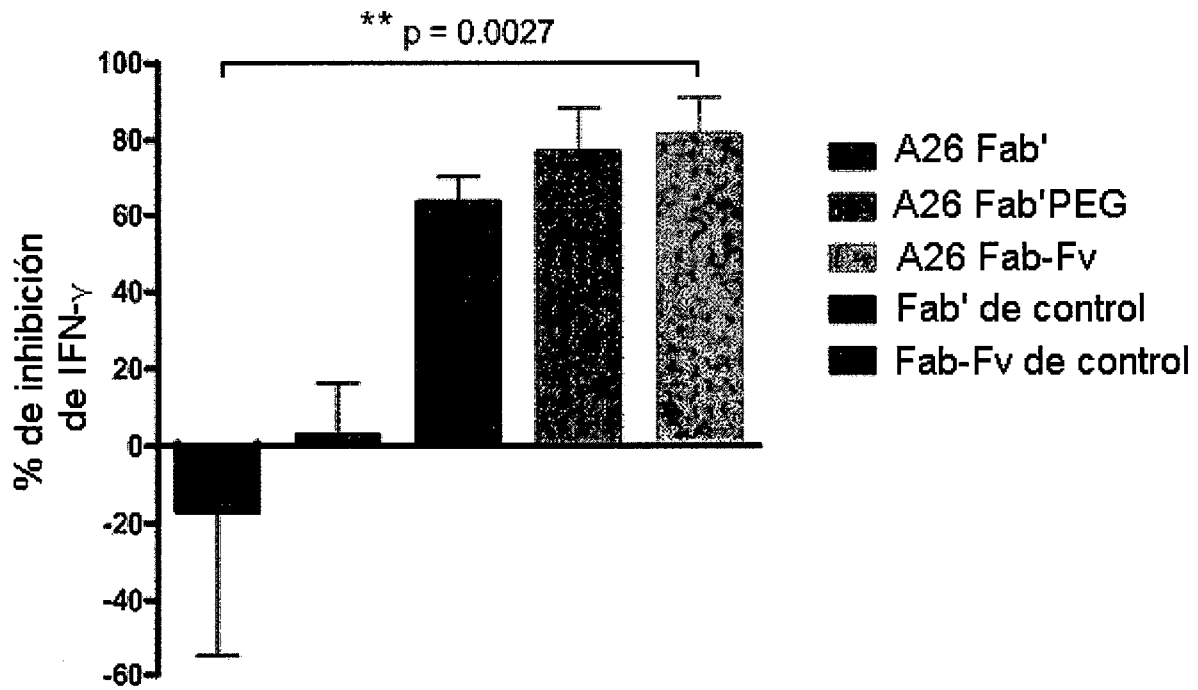


Figura 13

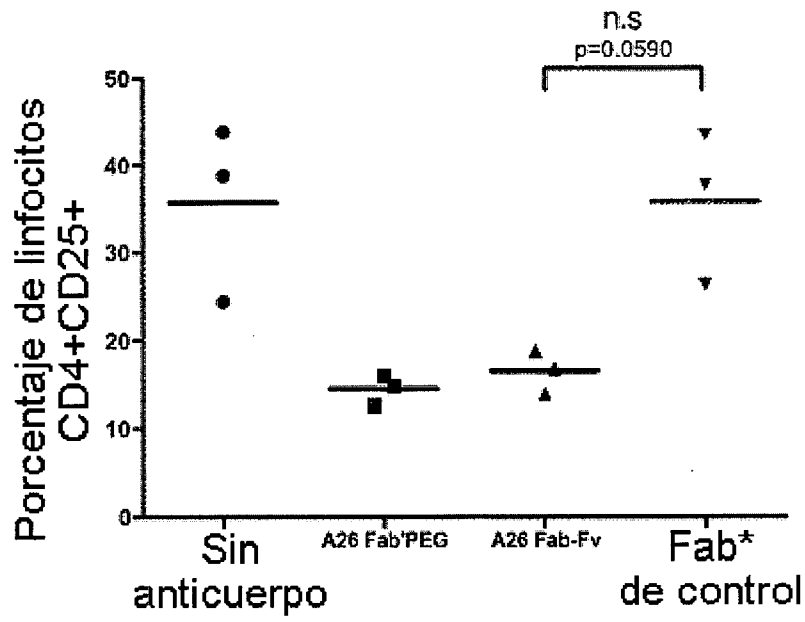


Figura 14A

A26 Fab-Fv administrado antes de la transferencia celular, inhibe de forma dependiente de la dosis la proliferación de linfocitos T CD4⁺ en el modelo Hu-NSG

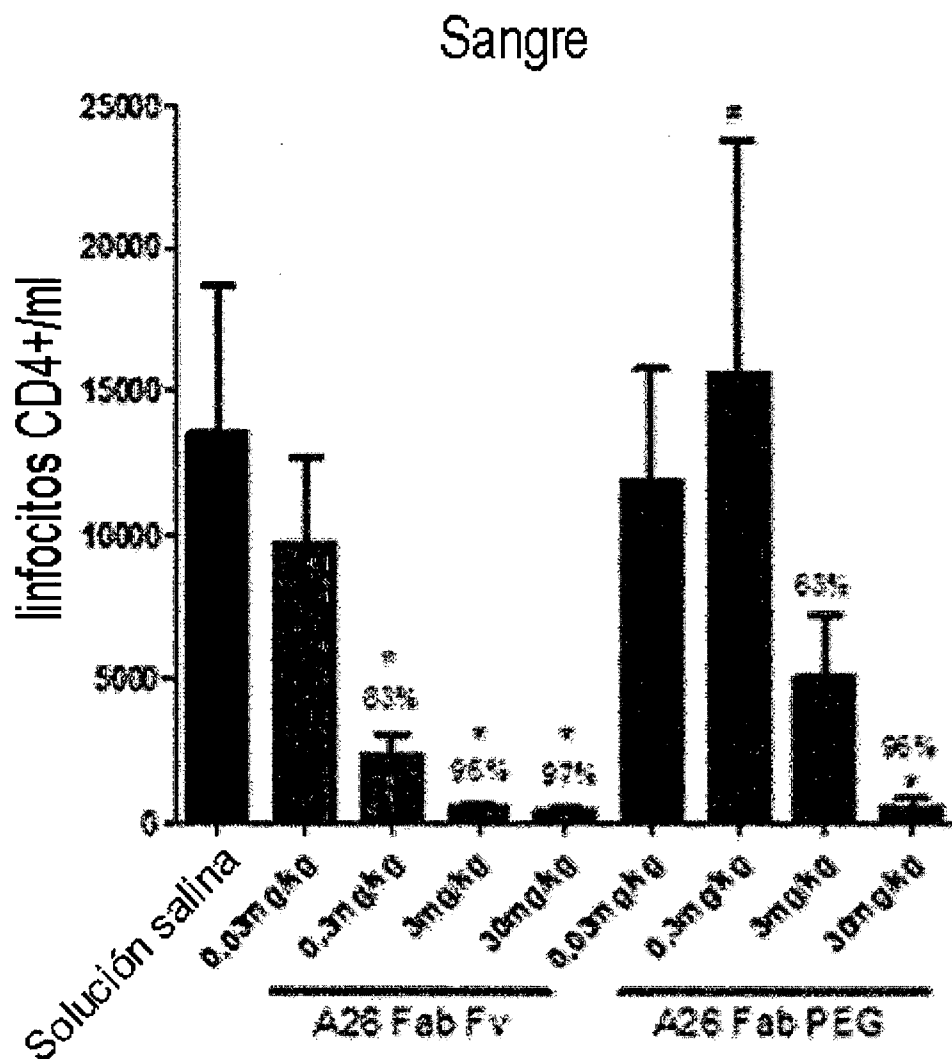


Figura 14 B

A26 Fab-Fv administrado de la transferencia celular, inhibe de forma dependiente de la dosis la proliferación de linfocitos CD8⁺ T en el modelo Hu-NSG

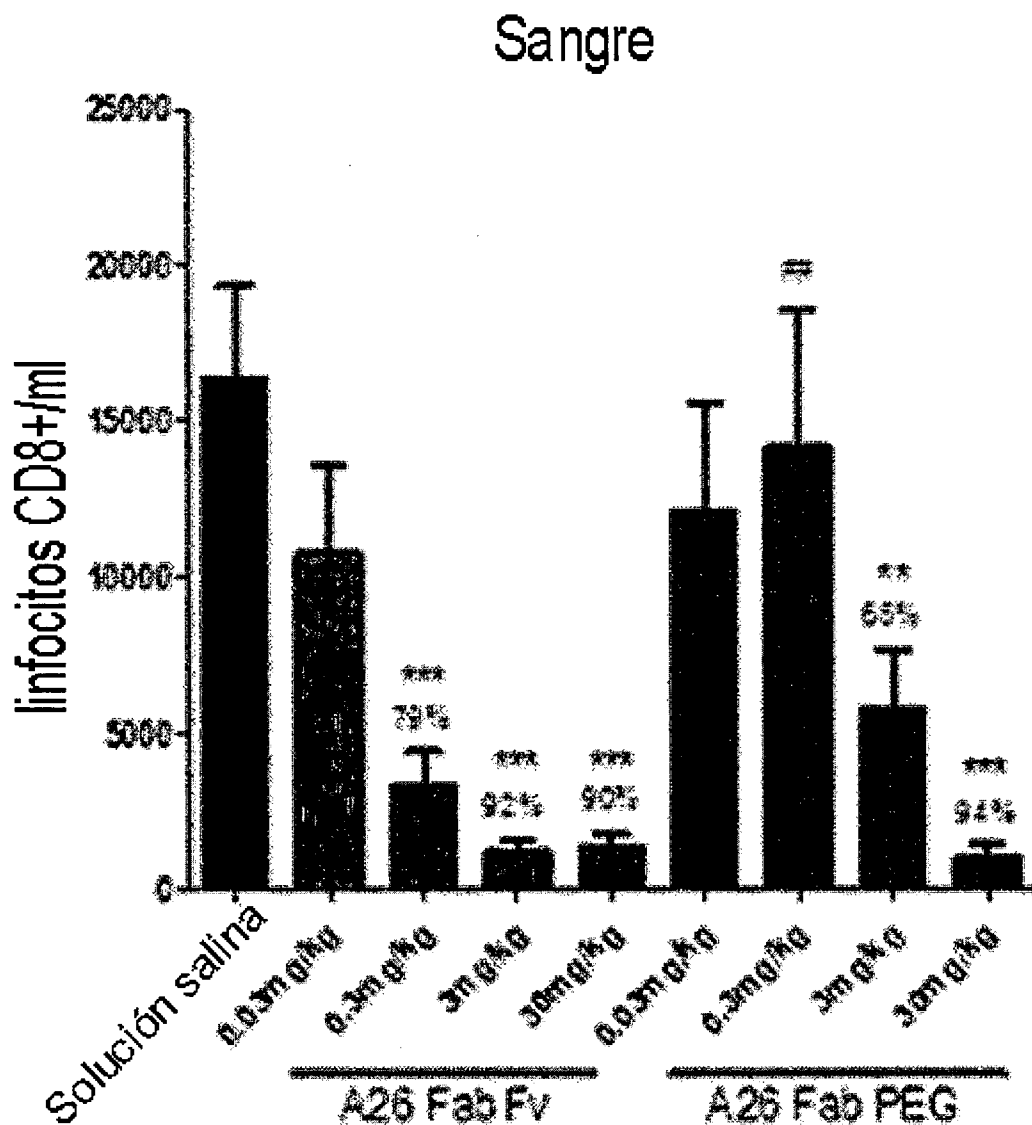


Figura 14C

A26 Fab-Fv administrado antes de la transferencia celular, inhibe de forma dependiente de la dosis la proliferación de linfocitos CD4⁺ T en el modelo Hu-NSG

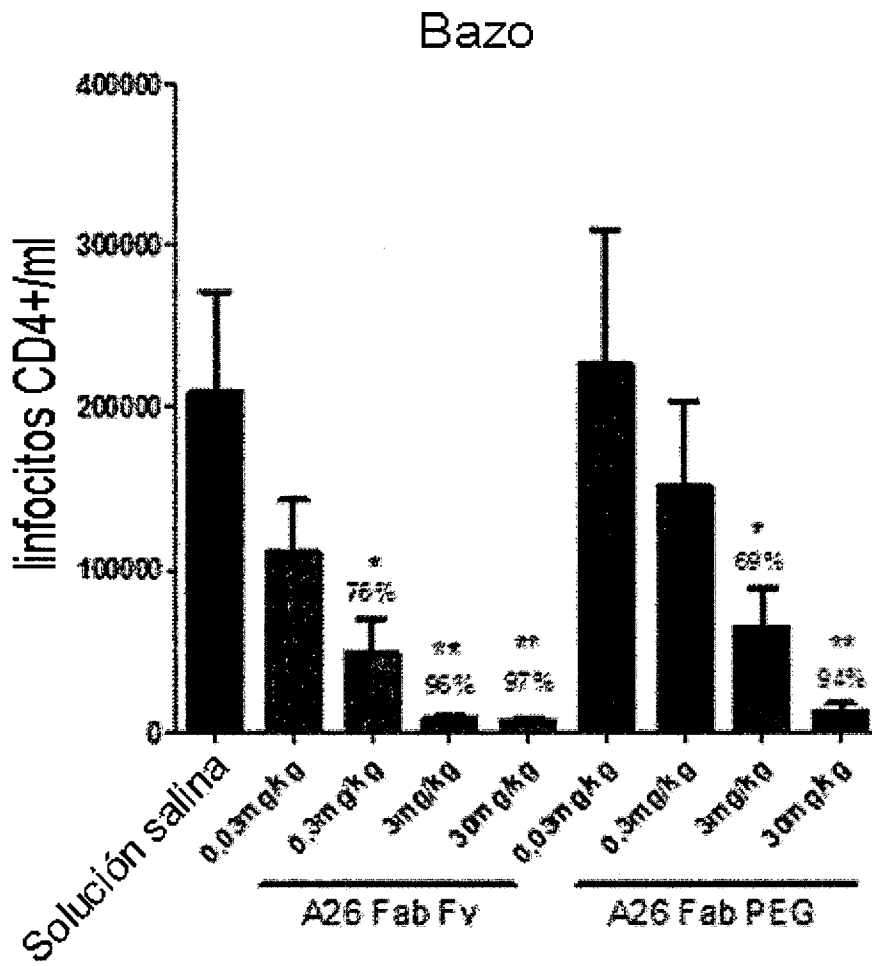
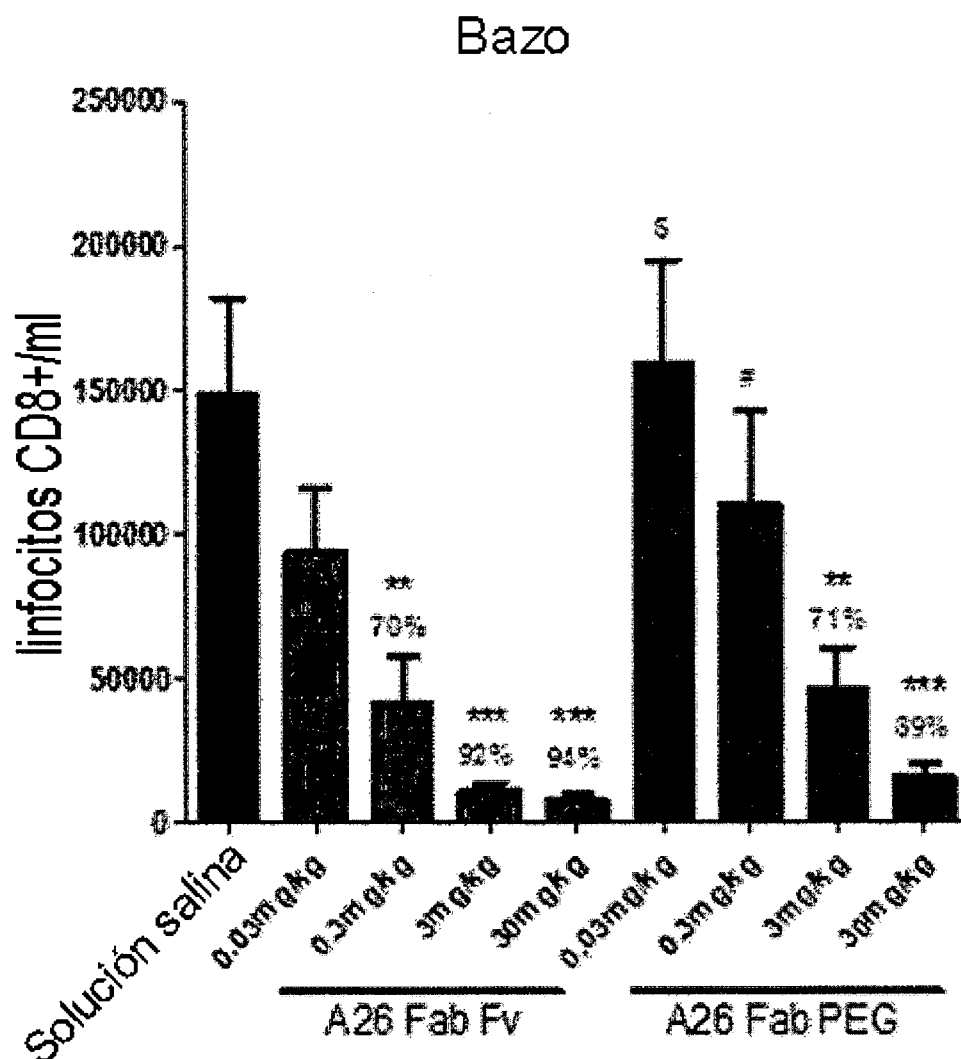


Figura 14D

A26 Fab-Fv administrado antes de la transferencia celular, inhibe de forma dependiente de la dosis la proliferación de linfocitos T CD4⁺ en el modelo Hu-NSG



901522ENSP_Sequences
LISTA DE SECUENCIAS

<110> UCB Pharma SA
<120> Moléculas que son anticuerpos con especificidad por OX40 humano
<130> G0160 W001
<150> US 61/558,545
<151> 2011-11-11
<160> 28
<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

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

901522ENSP_Sequences

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

<220>
<223> CDRL2

<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 la 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

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> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Región variable de la cadena pesada del anticuerpo A26

<400> 8

901522ENSP_Sequences

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> 9

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera del componente Fab del anticuerpo anti-0X40

<400> 9

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
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

901522ENSP_Sequences

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> 10
<211> 220
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena pesada del componente Fab del anticuerpo anti-OX40
<400> 10

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

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

901522ENSP_Sequences

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
 210 215 220

<210> 11
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena pesada del componente Fv anti-albúmina

<400> 11

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
 50 55 60

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

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

Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 12
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena ligera del componente Fv anti-albúmina

<400> 12

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn
 20 25 30

97

901522ENSP_Sequences

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

Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile
85 90 95

Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Conector 1

<400> 13

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Conector 2

<400> 14

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 15
<211> 357
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena pesada de A26 Fab -(G4S,G4T,G4S)-645dsFv(gH5)

<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
Página 6

901522ENSP_Sequences

65		70		75		80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg
				85		
				90		
				95		
Ala	Thr	Gly	Gly	Glu	Gly	Ile
			100			
				105		
				110		
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser
		115				
				120		
				125		
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr
	130					
				135		
				140		
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro
145					150	
				155		
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val
				165		
				170		
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser
		180				
				185		
				190		
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile
	195					
				200		
				205		
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val
	210					
				215		
				220		
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr
225					230	
				235		
Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu
			245			
				250		
Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Ile
		260				
				265		
				270		
Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys
		275				
				280		
				285		
Ala	Ser	Gly	Thr	Thr	Phe	Tyr
	290					
				295		
				300		
Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys
305					310	
				315		
Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala
			325			
				330		
Gly	Tyr	Ser	Thr	Ala	Pro	Tyr
			340			
				345		
Val	Thr	Val	Ser	Ser		
		355				

67

901522ENSP_Sequences

```

<210> 16
<211> 341
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena ligera de A26 Fab -(3xG4S)-645dsFv(gL4)

<400> 16
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
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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
210 215 220

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val
225 230 235 240

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro
245 250 255

Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

```

901522ENSP_Sequences

260 265 270

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val
275 280 285
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
290 295 300
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly
305 310 315 320
Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val
325 330 335
Glu Ile Lys Arg Thr
340

<210> 17
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Dominio variable de la cadena pesada 645gH1
<400> 17

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

<210> 18
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Dominio variable de la cadena ligera 645gL1
<400> 18

901522ENSP_Sequences

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile
85 90 95

Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 19
<211> 355
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena pesada de A26 Fab -(3xG4S)-645dsFv(gH1)

<400> 19

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
Página 10

901522ENSP_Sequences

145 150 155 160

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 Ser Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
225 230 235 240

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
245 250 255

Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp
260 265 270

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp
275 280 285

Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr
290 295 300

Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
305 310 315 320

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro Gly Tyr
325 330 335

Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
340 345 350

val Ser Ser
355

<210>	20
<211>	340
<212>	PRT
<213>	Artificial

<220>
<223> Cadena ligera de A26 Fab -(3xG4S)-645dsFv(qL1)

<400> 20

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

901522ENSP_Sequences

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 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 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 225 230 235 240
 Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser
 245 250 255
 Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 260 265 270
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly
 275 280 285
 Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 290 295 300
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly
 305 310 315 320
 Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
 325 330 335
 Val Glu Ile Lys

<210> 21
<211> 1137
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena pesada de A26-645(gH5) incluido el líder OmpA de E.coli

<400> 21
atgaagaaga ctgctatagc gatcgagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
gctgaagttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgctc agcctggagg gagcctgcgt 120
ctctcttggtg cagcaagcgg ttccacgttc accaactacg gtatccactg gattcgtcag 180
gcaccaggta aagggtctgga atgggtagcc tctatctctc cgtctggtgg tctgacgtac 240
taccgtgact ctgtcaaagg tcgtttcacc atctctcgtg atgacgcgaa aaactctccg 300
tacctgcaaa tgaactctct gcgtgcagaa gataccgcag tgtactactg cgctactggg 360
gggtgaaggta tcttcgacta ctgggggtcag ggtaccctgg taactgtctc gagcgcttct 420
acaaagggcc caagcgtttt cccactggct ccgtcctcta aatccacctc tgggtggtacg 480
gctgcactgg gttgcctggg gaaagactac ttcccagaac cagttaccgt gtcttggaac 540
tctggtgcac tgacctctgg tggtcacacc ttccagcag ttctccagtc ttctggtctg 600
tactccctgt ctagcgtggg taccgttccg tcttcttctc tgggtactca gacctacatc 660
tgcaacgtca accacaaacc gtccaacacc aaggtcgaca aaaaagtcga gccgaaatcc 720
tgtagtgagg gtgggggctc aggtggaggc gggaccggtg gaggtggcag cgaggttcaa 780
ctgcttgagt ctggaggagg cctagtccag cctggaggga gcctgcgtct ctcttggtgca 840
gtaagcggca tcgacctgag caattacgcc atcaactggg tgagacaagc tccggggaag 900
tgtttagaat ggatcgggtat aatatgggcc agtgggacga ctttttatgc tacatgggcg 960
aaaggaaggt ttacaattag ccgggacaat agcaaaaaca ccgtgtatct ccaaataaac 1020
tccttgcgag cagaggacac ggcggtgtac tattgtgctc gcactgtccc aggttatagc 1080
actgcaccct acttcgatct gtgggggaaa gggaccctgg tgactgtttc aagttaa 1137

<210> 22
<211> 1074
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena pesada de A26-645(gH5)

<400> 22
gaagttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggggag cctgcgtctc 60
tcttggtgag caagcgggtt cacgttcacc aactacggta tccactggat tcgtcaggca 120
ccaggtaaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctgggtggtct gacgtactac 180
cgtgactctg tcaaaggctg ttccaccatc tctcgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac 240
ctgcaaatga actctctgag tgcagaagat accgcagtggt actactgcgc tactggtggg 300
gaaggtatct tcgactactg gggtcagggt accctggtaa ctgtctcgag cgcttctaca 360
aagggcccaa gcgttttccc actggctccg tcctctaaat ccacctctgg tggtagggct 420
gcactggggt gcctggtgaa agactacttc ccagaaccag ttaccgtgtc ttggaactct 480

901522ENSP_Sequences

ggtgcactga cctctggtgt tcacaccttt ccagcagttc tccagtcttc tggctctgtac 540
tccctgtcta gcgtgggttac cgttccgtct tcttctctgg gtactcagac ctacatctgc 600
aacgtcaacc acaaaccgtc caacaccaag gtcgacaaaa aagtcgagcc gaaatcctgt 660
agtggaggtg ggggctcagg tggaggcggg accggtggag gtggcagcga gggttcaactg 720
cttgagtctg gaggaggcct agtccagcct ggagggagcc tgcgtctctc ttgtgcagta 780
agcggcatcg acctgagcaa ttacgccatc aactgggtga gacaagctcc ggggaagtgt 840
ttagaatgga tcggtataat atgggccagt gggacgacct tttatgctac atgggcgaaa 900
ggaaggttta caattagccg ggacaatagc aaaaacaccg tgtatctcca aatgaactcc 960
ttgcgagcag aggacacggc ggtgtactat tgtgctcgca ctgtcccagg ttatagcact 1020
gcaccctact tcgatctgtg gggacaaggg accctgggtga ctgtttcaag ttaa 1074

<210> 23
<211> 1089
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena ligera de A26-645(gL4) incluido el líder OmpA de E.coli

<400> 23
atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gcgttggctg gtttcgcgac cgttgcgcaa 60
gctgatatcc agatgacca gagcccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120
actattacct gtcgtgcaac ccagagcatc tacaacgctc tggcttggtg tcagcagaaa 180
ccgggtaaag cgccaaaact cctgatctac aacgcgaaca ctctgcatac tgggtgttccg 240
tctcgtttct ctgctcttgg ttctgggtacg gactctactc tgaccatctc ctctctccag 300
ccggaagatt tcgcgaccta ctactgccag cagtactacg attaccact 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 tacccatcag 660
ggtctgagct ctccggttac caaatccttt aatagagggg agtgtggtgg cggtggcagt 720
ggtggtggag gttccggagg tggcgggttca gacatacaaa tgaccagag tccttcatcg 780
gtatccgcgt ccgttggcga tagggtgact attacatgtc aaagctctcc tagcgtctgg 840
agcaattttc tatcctggta tcaacagaaa ccggggaagg ctccaaaact tctgatttat 900
gaagcctcga aactcaccag tggagtccg tcaagattca gtggctctgg atcagggaca 960
gacttcacgt tgacaatcag ttcgctgcaa ccagaggact ttgcgaccta ctattgtggt 1020
ggaggttaca gtagcataag tgatacgaca tttgggtgcg gtactaagggt ggaaatcaaa 1080
cgtacctaa 1089

<210> 24
<211> 1026
<212> ADN
<213> Artificial

901522ENSP_Sequences

<220>
 <223> Cadena ligera de A26-645(gL4)
 <400> 24
 gatatccaga tgacccagag cccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 60
 attacctgtc gtgcaaccca gagcatctac aacgctcttg cttgggtatca gcagaaaccg 120
 ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcatactgg tgttccgtct 180
 cgtttctctg cgtctgggtc tggtagcgac tctactctga ccatctcctc tctccagccg 240
 gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttggtggt 300
 ggtaccaaag ttgagatcaa acgtacgggt gcagctccat ccgtcttcat ctttccaccg 360
 tctgacgaac agctcaaadc tggtagtctt tctgtcgttt gcctcctgaa caacttctat 420
 ccgcgtgaag cgaaagtcca gtggaaagtc gacaacgcac tccagtctgg taactctcag 480
 gaatctgtga ccgaacagga ctccaaagac tccacctact ctctgtctag caccctgact 540
 ctgtccaaag cagactacga gaaacacaaa gtgtacgctt gcgaagttac ccatcagggt 600
 ctgagctctc cggttaccaa atcctttaat agaggggagt gtggtggcgg tggcagtgg 660
 ggtggagggt ccggagggtg cggttcagac atacaaatga cccagagtcc ttcacggta 720
 tccgcgtccg ttggcgatag ggtgactatt acatgtcaaa gctctcctag cgtctggagc 780
 aattttctat cctgggtatca acagaaaccg gggaaggctc caaaacttct gatttatgaa 840
 gcctcgaaac tcaccagtgg agttccgtca agattcagtg gctctggatc agggacagac 900
 ttcacgttga caatcagttc gctgcaacca gaggactttg cgacctacta ttgtggtgga 960
 ggttacagta gcataagtga tacgacattt ggggtgcggt ctaagggtgga aatcaaacgt 1020
 acctaa 1026

<210> 25
 <211> 1131
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena pesada de A26-645(gH5) incluida la secuencia líder B72.3
 <400> 25
 atggaatggt cctgggtctt cctgtttttc ctttctgtca caaccggggt gcacagcgag 60
 gtgcagctcg tcgagtctgg aggcgggctt gtccagcctg gagggagcct gcgtctctct 120
 tgtgcagcaa gcggtttcac gttcaccaac tacgggtatcc actggattcg tcaggcacca 180
 ggtaaagggtc tggaatgggt agcctctatc tctccgtctg gtggtctgac gtactaccgt 240
 gactctgtca aaggctgttt caccatctct cgtgatgacg cgaaaaactc tccgtacctg 300
 cagatgaact ctctgcgtgc agaagatacc gcagtgtact actgcgctac tgggtggtgaa 360
 ggtatcttcg actactgggg tcagggtacc ctggtaactg tctcaagcgc ttctacaaag 420
 ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 480
 ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccgggtg cggtgtcgtg gaactcaggc 540
 gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtccctctg actctactcc 600
 ctcagcagcg tggtagaccg gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 660
 gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagaaag ttgagcccaa atcttgttcc 720
 ggagggtggcg gttccggagg tggcgggtacc ggtggcggtg gatccgaagt ccagctgctt 780

901522ENSP_Sequences

gaatccggag gcggactcgt gcagcccga ggcagtcttc gcttgctctg cgctgtatct	840
ggaatcgacc tgagcaatta cgccatcaac tgggtgagac aggcacctgg gaaatgcctc	900
gaatggatcg gcattatatg ggctagtggg acgacctttt atgctacatg ggcgaagggg	960
agattcacia tctcacggga taatagtaag aacacagtgt acctgcagat gaactccctg	1020
cgagcagagg ataccgccgt ttactattgt gctcgactg tcccaggta tagcactgca	1080
ccctactttg atctgtgggg gcagggcact ctggtcaccg tctcgagttg a	1131

<210> 26
<211> 1074
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena pesada de A26-645(gH5)

<400> 26	
gaggtgcagc tcgtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc	60
tcttgtgcag caagcggttt cacgttcacc aactacggtg tccactggat tcgtcaggca	120
ccaggtaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctggtggtct gacgtactac	180
cgtgactctg tcaaaggctg tttcaccatc tctcgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac	240
ctgcagatga actctctgcg tgcagaagat accgcagtgt actactgcgc tactggtggt	300
gaaggtatct tcgactactg gggtcagggg accctggtaa ctgtctcaag cgcttctaca	360
aagggcccat cggctcttccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg	420
gccctgggct gcctgggcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca	480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc tggactctac	540
tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc	600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt	660
tccggagggtg gcggttccgg aggtggcggg accgggtggcg gtggatccga agtccagctg	720
cttgaatccg gaggcggact cgtgcagccc ggaggcagtc ttcgcttgtc ctgcgctgta	780
tctggaatcg acctgagcaa ttacgccatc aactgggtga gacaggcacc tgggaaatgc	840
ctcgaatgga tcggcattat atgggctagt gggacgacct tttatgctac atgggcgaag	900
ggtagattca caatctcacg ggataatagt aagaacacag tgtacctgca gatgaactcc	960
ctgcgagcag aggataccgc cgtttactat tgtgctcgca ctgtcccagg ttatagcact	1020
gcaccctact ttgatctgtg ggggcagggc actctgggtca ccgtctcgag ttga	1074

<210> 27
<211> 1086
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena ligera de A26-645(gL4) incluida la secuencia líder B72.3

<400> 27	
atgtcagttc ccacacaggt gctgggcctg cttctgttgt ggctcaccga tgctaggtgt	60
gatattccaga tgacctcagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact	120
attacctgtc gtgcaacca gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg	180

901522ENSP_Sequences

ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataaccgg tgttccgtct	240
cgtttctctg cgtctggttc tggtagcgac tctactctga ccatctcctc tctgcagccg	300
gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttggtggt	360
ggtaccaaag ttgagatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccccca	420
tctgatgagc agttgaagtc tggcactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctac	480
cctagagagg ccaaagtcca gtggaagggtg gataacgccc ttcaatccgg aaactcccag	540
gagagtgtca ctgagcagga ctcaaaggac tccacctata gccttagcag cacactgaca	600
ctgagcaagg ctgactacga gaaacacaag gtctacgcct gcgaagtgac acatcaaggc	660
ctgagctcac ccgtgacaaa gagctttaac aggggagagt gtggtggagg tggctctggc	720
ggtggtggct ccggaggcgg aggaagcgac atccagatga cccagagccc ttcctctgta	780
agcgccagtg tcggagacag agtgactatt acctgccaaa gctccccctt agtctggtcc	840
aattttctat cctggtacca gcaaaagccc ggaaaggctc ctaaattgct gatctacgaa	900
gcaagcaaac tcaccagcgg cgtgcccagc aggttcagcg gcagtgggtc tggaactgac	960
tttaccctga caatctcctc actccagccc gaggacttcg ccacctatta ctgcggtgga	1020
ggttacagta gcataagtga tacgacattt ggatgcggca ctaaagtgga aatcaagcgt	1080
acctga	1086

- <210> 28
- <211> 1026
- <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Cadena ligera de A26-645(gL4)

<400> 28	
gatatccaga tgacccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact	60
attacctgtc gtgcaacca gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg	120
ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataaccgg tgttccgtct	180
cgtttctctg cgtctggttc tggtagcgac tctactctga ccatctcctc tctgcagccg	240
gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttggtggt	300
ggtaccaaag ttgagatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccccca	360
tctgatgagc agttgaagtc tggcactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctac	420
cctagagagg ccaaagtcca gtggaagggtg gataacgccc ttcaatccgg aaactcccag	480
gagagtgtca ctgagcagga ctcaaaggac tccacctata gccttagcag cacactgaca	540
ctgagcaagg ctgactacga gaaacacaag gtctacgcct gcgaagtgac acatcaaggc	600
ctgagctcac ccgtgacaaa gagctttaac aggggagagt gtggtggagg tggctctggc	660
ggtggtggct ccggaggcgg aggaagcgac atccagatga cccagagccc ttcctctgta	720
agcgccagtg tcggagacag agtgactatt acctgccaaa gctccccctt agtctggtcc	780
aattttctat cctggtacca gcaaaagccc ggaaaggctc ctaaattgct gatctacgaa	840
gcaagcaaac tcaccagcgg cgtgcccagc aggttcagcg gcagtgggtc tggaactgac	900
tttaccctga caatctcctc actccagccc gaggacttcg ccacctatta ctgcggtgga	960
ggttacagta gcataagtga tacgacattt ggatgcggca ctaaagtgga aatcaagcgt	1020

acctga

1026

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020		Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD 2014 5 8	
		Recorrido: 4	
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-99147-	0	
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones: EL CD ANEXO CONTIENE UN TOTAL DE 1 ARCHIVO: 1 EN FORMATO BDC DE NOTAS, EL CUAL POR NO CUMPLIR CON LO ESTIPULADO EN LA CIRCULAR ÚNICA NO FUE PROCESADO. EL CD SE ENCUENTRA EN EL FOLIO 110



179

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of- Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF- ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

UCB PHARMA S.A.

domiciliado (s) en/of

ALLEE DE LA RECHERCHE 60
BRUSSELS B-1070
BELGIUM

17184
10715

por el presente nombramos a LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 DANIEL PEÑA, tpa. 65620 y GERMAN MARIN tpa. 64239, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint LUZ CLEMENCIA DE PAEZ tpa. 23555 DANIEL PEÑA, tpa. 65620 y GERMAN MARIN tpa. 64239, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as

modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this - 6 -04- 2009
en/in BRUSSELS
por/by Allen NORRIS
Proxy and legal representative
Firma Signature

CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que antecede de _____
es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de _____
de la compañía _____
sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de _____
que la dirección de dicha compañía es _____
y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.
Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.
Dado y firmado en _____
El _____

NOTARIAL CERTIFICATION (COMPANY)

The undersigned Notary certifies: That the preceding signature of _____
is authentic, that the signatory currently acts in the position of _____
Proxy and Legal Representative
of the company UCB PHARMA S.A
a company currently existing and organized under the laws of _____
Belgium
that the address is
ALLEE DE LA RECHERCHE 60
BRUSSELS B-1070
BELGIUM
and that the signatory has the power to grant this document.
The Notary Public is aware and attests to the above facts upon examination of the corresponding documents.
Given and signed in Brussels
On 06/04/2009

Damien HISETTE
Notaire associé - Geassocieerde notaris
Rue de l'Association 30 Verenigingstraat
Bruxelles 1000 Brussel

El Notario Público - The Notary Public
(Firma-sello) (Signature-seal)

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Pays: Belgique
2. Le présent acte public a été signé par: Hisette, Damien
3. Agissant en qualité de: Notaire
4. Est revêtu du sceau / timbre de: Notaire
Brussels
5. A Bruxelles
6. Le: 06/04/2009
7. Par le Service public fédéral Affaires étrangères, Commerce extérieur et Coopération
au Développement
8. Sous le n°: 9805090406080349
9. Sceau/timbre:
10. Signature:



Verfaillie Arnaud

114

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 08.24/09a realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

REPRESENTACIÓN Y PODER

Yo (nosotros), abajo firmado

UCB PHARMA S.A.

domiciliado en

ALLEE DE LA RECHERCHE 60

BRUSELAS B-1070

BÉLGICA

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

por el presente nombramos a LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555, DANIEL PEÑA tpa. 65620 y GERMÁN MARÍN tpa. 64239 domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1° del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la

ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, conferimos poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar,

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Y
TRADUCTOR E INTERPRETE JURIDICAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1990
AUT. JUDICIAL DE LA CORTE SUPLENTE

admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Dado y firmado hoy -6 -04- 2009-08-

En Bruselas
Firma Ilegible
Por Allen NORRIS
Apoderado y Representante Legal

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

El suscrito Notario certifica: Que la firma que antecede de Allen NORRIS es auténtica, que el signatario desempeña actualmente el cargo de Apoderado y Representante Legal de la compañía UCB PHARMA S.A, sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de Bélgica, que la dirección de dicha compañía es ALLEE DE LA RECHERCHE 60, BRUSELAS B-1070, BÉLGICA y que el signatario tiene facultad para otorgar éste documento.

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

Dado y firmado en Bruselas el 06/04/2009

Firma Ilegible
Notario Público Sello

Sello de Apostille expedido por Bélgica y certificado en Bruselas el 06/04/2009 con el no. 9805090406080349 y firmado por Verfaillie Arnaud.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ\DVZ\ID-156619\WPCL002H\COLO 17204-841-001-0

Diego F. Vega
Diego F. VARELA
TRADUCCION E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
MIS OPOS DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

118

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0047568

Bogotá D.C., Mayo 06 de 2014 - 16:54:54

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	644037461	06/05/2014	11.362.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-099147-00000-0000

Fecha: 2014-05-08 17:01:36
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 119 E20

Coto: 17184-841-002-2.

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 6 de 2014 - 16:55:02

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

116



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0047780

Bogotá D.C., Mayo 07 de 2014 - 11:36:49

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	41375	16/04/2014		1.000.00
RECIBO DE CA	999999999	44688	29/04/2014		13.000.00
RECIBO DE CA	999999999	45524	29/04/2014		106.000.00
RECIBO DE CA	999999999	45533	29/04/2014		128.000.00
RECIBO DE CA	999999999	45567	29/04/2014		62.000.00
RECIBO DE CA	999999999	45569	29/04/2014		1.000.00
RECIBO DE CA	999999999	47561	06/05/2014		464.000.00
RECIBO DE CA	999999999	47575	06/05/2014		93.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO

10 50005-01-01 SOLICITUDES

CONCEPTO

1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA
ADICIONAL A LAS 10 INIC

Vr.UNDITARIO

31.000.00

Vr.CONCEPTO

310.000.00

\$310.000.00

SON: **TRESCIENTOS DIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-099147-00000-0000

Fecha: 2014-05-08 17:01:36

Tra. 11 PATENTE IYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 119

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

C.O. 17184-844-002-2.

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

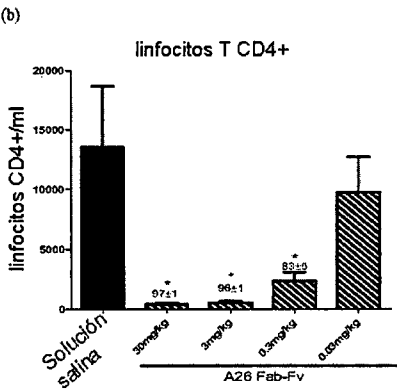
Mayo 7 de 2014 - 11:36:50

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 61/558,545 2011/11/11 US		(51) Int Cl: C07K 016/028 (71) Solicitante(s) UCB PHARMA, S.A. (72) Inventor(es) RALPH ADAMS Y OTROS (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 2014/06/11 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 2012/11/09 No. de solicitud PCT/EP2012/073325		(87) Publicación internacional Fecha: 2013/05/16 N° publicación: WO 2013/068563 A3	
(54) Título: MOLÉCULAS QUE SON ANTICUERPOS CON ESPECIFICIDAD POR OX40 HUMANO			

Resumen:

La invención se refiere a moléculas que son anticuerpos con especificidad por determinantes antigénicos de OX40 humano, a usos terapéuticos de las moléculas que son anticuerpos y a métodos para producir dichas moléculas que son anticuerpos.

Figura 10



PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

120

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-099147- -00000-0000

Fecha: 2014-05-08 17:01:36
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 128

120