

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-060426-00017-0000

Fecha: 2016-06-17 15:47:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 109

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 16-160084-00000-0000

Fecha: 2016-06-17 15:47:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 109

Industria y Comercio Ju

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

DIVISIONAL PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: ANTICUERPOS ANTI-CD134 (OX40) Y USOS DE LOS MISMOS

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL

71. SOLICITANTES: 1. BIOCEROX PRODUCTS B.V.

DOMICILIOS: Yalelaan 46 NL-3584 CM. Therwil Holanda

74. APODERADO CAROLINA MERCEDES DAZA

MONTALVO

22. BOGOTÁ, D.C.

16-160084



No. 14-060426-00017-0000

Fecha: 2016-06-17 15:47:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 851 DIVISIONAL Folios: 109



No. 16-160084-00000-0000

Fecha: 2016-06-17 15:47:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 109

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

- ☐ Conversión
 ☒ División
 ☐ Fusión
- ☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐Persona Jurídica ☒**BIOCEROX PRODUCTS B.V.**

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
HOLANDA	Yalelaan 46 NL-3584 CM.	Therwil
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

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

3. Datos del apoderado:

DAZA MONTALVO CAROLINA MERCEDES**C.C. 66.783.790****141563**

Apellidos y Nombres

Documento de identificación

Tarjeta profesional

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

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

4. Datos del trámite

CONVERSION

Expediente _____

De: _____

A: _____

DIVISION

Expediente

14-060426

De: _____

A: _____

FUSION

Expediente _____

De: _____

A: _____

5. Comprobante de Pago No _____ Fecha

6. Anexos

☒

Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación

☐

Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación

☐

Número de documento que ordena la comisión o fusión o división

☐

Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud

☐

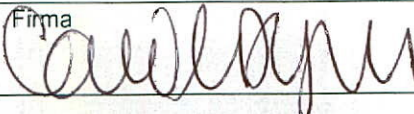
Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma

Nombre y apellidos

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO

Firma



C.C. 66.783.790

Tarjeta Profesional 141563 CSJ

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT		
Solicitud Internacional No.		PCT/GB2012/052268	Fecha 13/09/2012
Publicación Internacional No.		WO 2013/038191	Fecha 21/03/2013
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
ANTICUERPOS ANTI-CD134 (OX40) Y USOS DE LOS MISMOS			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
BIOCEROX PRODUCTS B.V.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		No. TELÉFONO	
Yalelaan 46 NL-3584 CM.			
CIUDAD		CORREO ELECTRÓNICO	
Therwil			
DEPARTAMENTO/ESTADO		NACIONALIDAD O	
PAÍS DE RESIDENCIA		LUGAR DE CONSTITUCIÓN	
HOLANDA		HOLANDA	
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. SIMONS		Petrus Johannes	Holandesa
2. BOON		Louis	Holandesa
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
3. HOLANDA		Hillegom	Leidsestraat 43 NL-2182DH
4. HOLANDA		Badhoevedorp	Orehideelaan 137 NL-1171MG
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en hoja de información complementaria.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☐ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
DAZA MONTALVO		CAROLINA MERCEDES	C.C. 66.783.790 T.P. 141563
DIRECCIÓN		No. TELÉFONO	
Carrera 11 No. 86-53, Piso 6,		6181088	
CIUDAD		CORREO ELECTRÓNICO	
Bogotá		notificaciones@clarkemodet.com.co	
PAÍS		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	
Colombia			
10	DECLARACIÓN(ES) DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO (32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. GRAN BRETAÑA		GB	1116092.6 16/09/2011

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 4			
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 ☐			
Si aplica, debe aportar los soportes de acuerdo a lo que se indica en el numeral 18 - Documentos que acompañan la solicitud			
14	RESUMEN		
Adjuto.			
15	FIGURA CARACTERISTICA		
16	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N°	Fecha
17	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>		
 CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO			
18	DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios:		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones:		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☐ Dibujos y/o figuras N° folios:		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☒ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10. X	

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

S



RECIBO DE CAJA

No. 16 - 0057691

Bogotá D.C., Junio 09 de 2016 - 16:10:35

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	810650934	08/06/2016	1.280.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERECHO A 10 INICIALES	80.000.00	80.000.00
				\$80.000.00

SON: **OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 16-160084-00000-0000

Fecha: 2016-06-17 15:47:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 10-9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-060426-00017-0000

Fecha: 2016-06-17 15:47:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 10-9

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-916165 Call Center: (571) 6513240

Junio 9 de 2016 - 16:10:35

S

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

6



RECIBO DE CAJA

No. 16 - 0056159

Bogotá D.C., Junio 07 de 2016 - 15:00:11

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	810651085	07/06/2016	1.034.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES	EN TRAMITE / MODIFICACION CAP. DESCRIPTIVO O REIVINDICATORIO	164.000.00	164.000.00
				\$164.000.00

SON: **CIENTO SESENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 16-160084- -00000-0000

Fecha: 2016-06-17 15:47:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 109

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-060426- -00017-0000

Fecha: 2016-06-17 15:47:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. B51 DIVISIONAL Folios: 109

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

Junio 7 de 2016 - 15:00:12

6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

7

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 16 - 0057692

Bogotá D.C., Junio 09 de 2016 - 16:10:35

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	810650934	08/06/2016	1.280.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
28 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	40.000.00	1.120.000.00
				\$1.120.000.00

SON: **UN MILLON CIENTO VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-060426- -00017-0000
Fecha: 2016-06-17 15:47:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 10-9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 16-160084- -00000-0000
Fecha: 2016-06-17 15:47:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 409

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

Junio 9 de 2016 - 16:10:35

7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

8



RECIBO DE CAJA

No. 16 - 005904

Bogotá D.C., Enero 25 de 2016 - 15:54:05

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	776933393	25/01/2016	6.439.070.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	80.000.00	80.000.00
				\$80.000.00

SON: **OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 16-160084-00000-0000

Fecha: 2016-06-17 15:47:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 49

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-060426-00017-0000

Fecha: 2016-06-17 15:47:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 49

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

Enero 25 de 2016 - 15:54:12

8

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	TESTIGO DOCUMENTAL	Folio: <u>9</u>
--	---------------------------	-----------------

Dependencia Jerárquica: DEL PROPIEDAD INDUSTRIAL		Código	2000
Dependencia Productora: GRUPO DE NUEVAS CREACIONES		Código	2020
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:			
DESCRIPCIÓN DE LA PRUEBA			
Nombre de la Serie / Subserie:		Código:	
Expediente: 14-60426-17 16-160084-0		Solicitante / Quejoso / Demandante / otros.	
Prueba excluida: cd			
N°. de Pruebas excluidas: 1			
Fecha de emisión de la Prueba:			
UBICACIÓN DE LA PRUEBA EN LA SECCIÓN DE MATERIAL GRÁFICO			
N°. de bloque:		Otras especificaciones:	
N°. de rodante:			
N°. de estante:			
N°. de archivador:			
N°. de entropaño:			
N°. de gaveta:			
N°. de caja:			
IMPORTANTE: - El material gráfico o especial que se encuentra dentro o anexo a las unidades documentales o expedientes, debe extraerse y llevarse a aquella sección del archivo que se haya dispuesto para conservar documentos en distintos formatos. - Entiéndase por material gráfico todos aquellos dibujos, croquis, mapas, planos, fotografías, ilustraciones, pictografías, códices, prensa, objetos tridimensionales, entre otros.			
Observaciones:		Unidad de Conservación ☐ Bolsa ☐ Caja ☐ Libro ☐ Sobre ☐ Tomo ☐ Otro	
<u>EL GD CONTIENE: 1 archivo en formato pdf, procesado y cargado al sistema.</u> <u>1 archivo de texto, no procesado</u>		Soporte Documental ☒ CD ☐ Disquete ☐ DVD ☐ Folleto ☐ Periódico ☐ Plano ☐ Publicación Periódica ☐ USB ☐ Otro	

MF
JV

ANTICUERPOS ANTI-CD134 (OX40)

Campo de la invención

La invención se refiere a anticuerpos, al uso de dichos anticuerpos y particularmente a anticuerpos que se unen a CD134, para el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

La potenciación de la función antitumoral de las células T representa una estrategia para el tratamiento del cáncer. Existen pruebas considerables de que las células tumorales se “escapan” del sistema inmunitario por inducción de una tolerancia inmunitaria activa en gran medida mediada por linfocitos T reguladores (Tregs; Quezda et al. Immunol Rev 2011; 241:104-118). Por lo tanto, el equilibrio entre los linfocitos T efectores (Tefs) (es decir, erradicación directa o indirecta de células tumorales) y Tregs tolerogénicos (es decir, supresión de la función y supervivencia de efectores Tefs) parece ser crucial para una inmunoterapia antitumoral eficaz. En otras palabras, puede obtenerse una respuesta inmunitaria antitumoral eficaz potenciando la función efectora de los Tefs específicos tumorales y/o atenuando la función supresora de los Tregs específicos tumorales. Un receptor clave que se ha mostrado que media estas respuestas es el receptor CD134 (OX40). (Sugamura, K, Ishii, N, Weinberg, A. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. Nature Rev Imm 2004; 4: 420-431).

El CD134 (conocido también como OX40, TNFRSF4 y ACT35) es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral. Este receptor coestimulador de superficie CD134 se expresa sobre linfocitos T activados, y desempeña una función importante en su supervivencia y función. La presencia de linfocitos T que expresan CD134 se ha demostrado en diversos tumores malignos humanos y en los nódulos linfáticos de drenaje de pacientes con cáncer (Ramstad et al. Am J Surg 2000; 179: 400-406; Vetto et al. Am J Surg 1997; 174: 258-265).

El ligamiento *in vivo* del receptor CD134 (por proteínas de fusión de ligando de OX40 (OX40L) de ratón soluble - inmunoglobulina o miméticos de OX40L de ratón, tales como anticuerpos de ratón anti-CD134 específicos) en ratones portadores de tumor potencia la inmunidad antitumoral, conduce a la supervivencia sin tumor en modelos de ratón de diversas líneas de células tumorales malignas murinas, por ejemplo, de linfoma, melanoma, sarcoma, cáncer de colon, cáncer de mama, y glioma (Sugamura et al. Nature Rev Imm 2004; 4: 420-431).

Se ha propuesto potenciar la respuesta inmunitaria de un mamífero contra un antígeno activando el OX40R a través del uso de un agente de unión a OX40R (documento WO 99/42585; Weinberg, 2000). Aunque el documento hace referencia, en líneas generales, a agentes de unión a OX40, al hincapié en el uso de OX40L o partes del mismo; la descripción de anticuerpos anti-OX40 es en el contexto de ser su equivalente a OX40L. De hecho, cuando el equipo de Weinberg traslada la investigación a un estudio con primates no humanos, de nuevo selecciona deliberadamente un anticuerpo que se une al

sitio de unión de OX40L y que generalmente imita a OX40L.

Al-Shamkhani et al. (Eur J Chem 1996; 26: 1695-1699) utilizaron un anticuerpo anti-OX40 denominado OX86, que no bloqueaba la unión a OX40L, para explorar la expresión diferencial de OX40 sobre células T de ratón activadas; y Hirschhorn-Cymerman et al. (J Exp Med 2009; 206: 1103-1116) usaron conjuntamente OX86 con ciclofosfamida en un modelo de ratón como una posible quimioinmunoterapia. Sin embargo, no se esperaba que OX86 se uniese a OX40 humano y, cuando se seleccionó un anticuerpo que podría ser eficaz en seres humanos, podría, a la luz del trabajo de Weinberg, seleccionarse un anticuerpo que se hubiese unido al sitio de unión de OX40L.

El ligamiento *in vivo* del receptor CD134 humano (por anticuerpos específicos anti-CD134 humanos que interaccionan con el dominio de unión a OX40L en el CD134 humano; documento US 2009/0214560 A1) en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) potencia la inmunidad antitumoral, lo que conduce a la inhibición del crecimiento tumoral de diversas líneas de células tumorales malignas humanas, por ejemplo, linfoma, cáncer de próstata, cáncer de colon y cáncer de mama.

El mecanismo exacto de las respuestas inmunitarias antitumorales mediadas por el ligamiento de CD134 en seres humanos aún no se ha aclarado, pero se piensa que está mediado a través de la ruta de señalización transmembrana de CD134 que está estimulado por la interacción con OX40L. Esta interacción está mediada por la unión del OX40L trimérico a CD134. En las terapias actuales contra el cáncer, el uso del ligando OX40 trimerizado se propone como un agente más eficaz que los anticuerpos anti-OX40 (Morris et al. Mol Immunol 2007; 44: 3112-3121).

Sumario de la invención

Los solicitantes han descubierto ahora, de manera sorprendente, que para inducir la actividad antitumoral mediada por células T, el uso de moléculas de unión aisladas que se unen al CD134 humano, en el que la molécula de unión no impide la unión del receptor CD134 (CD134) humano con el ligando de OX40 (OX40L), produce una respuesta inmunitaria potenciada, caracterizada por la potenciación de la función inmunoestimuladora/efectora de células T efectoras y/o proliferación de aquellas células y/o regulación negativa de la función inmunosupresora de células T reguladores.

Por lo tanto, la presente invención proporciona moléculas de unión aisladas que se unen al CD134 humano, en el que la molécula de unión no impide la unión del receptor CD134 (OX40) humano con el ligando de OX40 (OX40L).

Dichas moléculas de unión incluyen anticuerpos anti-CD134 adecuados, fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos anti-CD134 y derivados de los anticuerpos anti-CD134. En algunas realizaciones la molécula de unión se une al CD134 humano con una K_d de 1×10^{-7} M o menor. La molécula de unión tiene actividad agonista sobre el CD134 humano en células T efectoras y/o actividad antagonista sobre el CD134 humano en células T reguladoras. En algunas realizaciones adicionales, la molécula de unión es un anticuerpo monoclonal humano que se une específicamente al CD134 humano con una K_d de 100 nM

o menor, preferentemente menor de 50 nM, más preferentemente menor de 20 nM.

La presente invención también proporciona una composición que comprende una o más de las moléculas de unión y un transportador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la molécula de unión es un anticuerpo monoclonal anti-CD134 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo. La composición también puede comprender agentes farmacéuticos adicionales, tales como agentes inmunoterapéuticos, agentes quimioterapéuticos y agentes terapéuticos hormonales.

La presente invención también proporciona métodos de diagnóstico y terapéuticos del uso de las moléculas de unión. En algunas realizaciones se proporciona un método de tratamiento o prevención del cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión o una composición que comprende una molécula de unión como se desvela en el presente documento. En algunas otras realizaciones, la descripción proporciona un método para potenciar una respuesta inmunitaria en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión o una composición que comprende una molécula de unión. En realizaciones particulares, la molécula de unión usada en los métodos es un anticuerpo monoclonal anti-CD134 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al CD134 humano, en el que el anticuerpo no impide que el receptor CD134 humano (OX40) se una al ligando de OX40 (OX40L).

La presente invención proporciona adicionalmente moléculas de ácido nucleico que codifican una secuencia de aminoácidos de una molécula de unión, vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos, células hospedadoras que comprenden los vectores, y métodos de preparación de las moléculas de unión.

La descripción también proporciona otros aspectos, que serán obvios en toda la descripción, incluyendo las reivindicaciones.

Descripción de las Figuras

La invención se describe con referencia a los dibujos adjuntos:

Figura 1. Evolución y efecto de la dosis de la exposición a PHA-M sobre la expresión del CD134 humano de superficie de linfocitos T humanos.

Figura 2. Expresión de CD134 humano sobre linfocitos T CD4 humanos activados por PHA-M y en reposo.

Figura 3. Características de unión de anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clon ACT35, clon 12H3 y clon 20E5 sobre linfocitos T que expresan CD134 humano estimulados por PHA-M.

Figura 4. Unión de anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 y clon 20E5 sobre linfocitos T CD4 y linfocitos CD8 T que expresan CD134 humano estimulados con PHA-M.

Figura 5. Competición cruzada de anticuerpos de ratón anti-CD134 humano no marcados clon 12H3 o clon 20E5 con anticuerpos de ratón anti-CD134 comerciales

conjugados con PE clon ACT35 o clon L106 sobre linfocitos T que expresan CD134 humano estimulados con PHA-M.

Figura 6. Unión simultánea de anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 o clon 20E5 con OX40L humano sobre linfocitos T que expresan CD134 humano
5 estimulado con PHA-M.

Figura 7. Efecto de la evolución de la exposición a perlas estimuladoras de anticuerpo anti CD3 humano/anti-CD28 humano sobre la expresión del CD134 humano de superficie de linfocitos T efectores (Tefs) humanos y de linfocitos T reguladores (Tregs).

Figura 8. Efecto de la dosis de la exposición a anticuerpos de ratón anti-CD134
10 humano clon 12H3 o clon 20E5, o contra OX40L humano sobre la proliferación de linfocitos T que expresan CD134 humano estimulados con PHA-M.

Figura 9. Efecto de la combinación de anticuerpos de ratón anti-CD134 humanos clon 12H3 con OX40L, o anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 con OX40L humano sobre la proliferación de linfocitos T que expresan CD134 humano estimulados
15 con PHA-M.

Figura 10. Efecto de la exposición a anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 o clon 20E5, o a OX40L humano sobre la proliferación de linfocitos T efectores humanos que expresan CD134 humano estimulados con perlas estimuladoras de anticuerpos anti-CD3 humano/anti-CD28 humano.

Figura 11. Efecto de la exposición a anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clon
20 12H3 o clon 20E5, o a OX40L humano sobre la proliferación de linfocitos T efectores humanos que expresan CD134 humano estimulados con perlas estimuladoras de anticuerpos anti-CD3 humano/anti-CD28 humano.

Figura 12. Efecto del anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 sobre la
25 proliferación mediada por OX40L humano de linfocitos T efectores (A) y reguladores (B) humanos que expresan CD134 humano estimulados con perlas estimuladoras de anticuerpo anti-CD3 humano/anti CD28 humano.

Figura 13. Efecto de la exposición a anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clon
30 12H3 o clon 20E5, o a OX40L humano sobre la supresión mediada por linfocitos T reguladores humanos que expresan CD134 humano de la proliferación de linfocitos T efectores humanos que expresan CD34 humano.

Figura 14. Unión del anticuerpo quimérico IgG4κ humano anti-CD134 humano clon
20E5 sobre linfocitos T CD4 y linfocitos T CD8 que expresan CD134 humano estimulados con perlas CD3/CD28 (sin o con IL-2).

Figura 15. Efecto del anticuerpo quimérico IgG4κ humano anti-CD134 humano
35 clon 20E5 u OX40L humano sobre la proliferación de linfocitos T que expresan CD134 humano estimulados con PHA-M.

Figura 16. Efecto de la dosis de la exposición al anticuerpo quimérico IgG4κ
40 humano anti-CD134 humano clon 20E5 o a OX40L sobre la proliferación de linfocitos T que expresan CD134 humano estimulados por PHA-M.

Figura 17. Efecto de la combinación del anticuerpo quimérico IgG4κ humano anti-CD134 humano clon 20E5 con OX40L humano sobre la proliferación de linfocitos T que expresan CD134 humano estimulados con PHA-M.

Figura 18. Efecto del anticuerpo quimérico IgG4κ humano anti-CD134 humano clon 20E5 o OX40L humano sobre la proliferación de linfocitos T que expresan CD134 humano estimulados con perlas CD3/CD28 (sin y con IL-2)

Figura 19. Unión de anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5 con la proteína de fusión Fcγ humano:CD134 humano recombinante en condiciones reductoras y no reductoras. (A) Condiciones examinadas no reductoras (a, b) y reductoras (c, d). (B) Modelos de migración electroforética de la proteína de fusión Fcγ humano:CD134 humano recombinante (rhuCD134) en condiciones no reductoras (a, b) y reductoras (c, d) usando tinción con azul brillante de Coomassie. (C) Transferencia de Western de la proteína de fusión CD134 humano:Fcγ humano recombinante en condiciones no reductoras (a, b) y reductoras (c, d) expuesta a anticuerpo de control de ratón isotipo IgG1κ (mIgG1) o a anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5 (m12H3 y m20E5, respectivamente).

Figura 20. Representación esquemática de dominio ricos en cisteína (DRC) en CD134 humano de longitud completa (indicado como “DRC1”) y en diversas formas truncadas de CD134 humano (indicadas como “DRC2”, “DRC3”, “DRC4” y “DRC4 truncado” (tc)).

Figura 21. Unión de anticuerpos de ratón anti-CD134 humanos clones 12H3 y 20E5 sobre la línea celular 293-F transfectada de manera transitoria con la construcción de CD134 humano de longitud completa (indicado como “DRC1”) o con diversas construcciones de CD134 humano truncadas (indicadas como “DRC2”, “DRC3”, “DRC4” y “DRC4 truncado (tc)”).

Figura 22. Unión de anticuerpos quiméricos IgG4κ y/o IgG1κ humanos anti-CD134 humano, clones 12H3 y 20E5 sobre la línea celular 293-F transfectada de manera transitoria con la construcción de CD134 humano de longitud completa (indicada como “DRC1”) o con diversas construcciones truncadas de CD134 humano (indicadas como “DRC2”, “DRC3”, “DRC4” y “DRC4 truncado” (tc)).

Figura 23. Unión del anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 (A) y anticuerpo quimérico anti-CD134 humano IgG4κ humano clon 12H3 (B) con péptido derivado de CD134 humano, que corresponde a la secuencia de aminoácidos del módulo A1 subdominio CRD4-módulo A1 de CRD3 truncado (de acuerdo con la definición de Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683).

Descripción de la invención

La activación de las células T no solo está mediada por la estimulación de antígenos a través de receptores de células T sino también por señales coestimuladoras mediante moléculas coestimuladoras. Entre las diversas moléculas coestimuladoras, el miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), OX40 (CD134) desempeña

una función clave en la supervivencia y homeostasis de células T efectoras y de memoria. De acuerdo con el entendimiento convencional de la coestimulación de OX40, se produce una interacción entre OX40 y el ligando de OX40 (OX40L) cuando las células T activadas se unen a células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales. Las funciones de las células T, incluyendo la producción de citocina, expansión y supervivencia están por tanto potenciadas por las señales coestimuladoras de OX40. La interacción entre OX40 y OX40L se produce durante la interacción entre las Células Dendríticas (CD)-células T, 2-3 días después del reconocimiento antigénico. La célula T que expresa OX40 también puede interaccionar con una célula que exprese OX40L que no sea una CD y recibir una señal de la célula para OX40, que puede proporcionar señales esenciales para la generación de células T de memoria, la potenciación de la respuesta Th2 y la prolongación de respuestas inflamatorias. Por tanto, la interacción óptima entre OX40 y OX40L podría formarse en dos etapas: OX40L expresado en células T CD4 activadas interacciona con OX40 expresado en otras células T CD4 respondedoras, lo que conduce a la generación óptima de células T CD4 de memoria (Soroosh et al., 2006) u OX40L expresado en células accesorias CD4+ pueden promover la supervivencia de células Th2 a través de la interacción con OX40 en células Th2 (Kim et al. 2003). Además, la expresión de OX40L en células B es necesaria para el desarrollo *in vivo* de Th2, pero no para el desarrollo de Th1 (Linton et al. 2003) y los mastocitos que expresan OX40L directamente potencian la función de células T efectoras a través de la interacción entre OX40 en células T y OX40L en mastocitos (Kashiwakura et al. J Immunol 2004; 173: 5247-5257; Nakae et al. J Immunol 2006; 176: 2238-2248). Además, dado que las células endoteliales también expresan OX40L (Imura et al. 1996), la unión de OX40 a células endoteliales podría estar implicada en la inflamación vascular. El exceso de señales OX40, tanto a células T respondedores como a células T reguladores, suprime la inmunosupresión mediada por Treg. Las señales de OX40 que pasan a las células T respondedoras las hacen resistentes a la supresión mediada por Treg. Por otro lado, las señales de OX40 que pasan a las células Treg directamente inhiben la función supresora de Treg, aunque es controvertido si las señales de OX40 podrían controlar el nivel de expresión de Foxp3 en células Treg. Además, la estimulación de OX40 deliberada inhibe la diferenciación dependiente del TGF-beta de células iTreg (células Treg inducibles). La inhibición puede estar mediada, en parte, por citocinas efectoras, tales como IL-4 e IFN-gamma producidas por células T efectoras estimulados con OX40. Cabe destacar que, el bloqueo de OX40L promueve notablemente la diferenciación de iTreg e induce la tolerancia a injerto, lo que podría estar mediado por células Treg. Por lo tanto, OX40 es una posible diana molecular para el control de la autoinmunidad mediada por células T. Además, recientes estudios publican que la interacción entre OX40L expresado por mastocitos y OX40 expresado por células Treg puede suprimir mutuamente la función de mastocitos y la función supresora de células Treg (Gri et al. 2008; Piconese et al. 2009).

Los ratones son la herramienta experimental de elección para los inmunólogos, y el estudio de sus respuestas inmunitarias ha proporcionado un enorme entendimiento en los

trabajos del sistema inmunitario de seres humanos. La estructura general del sistema de ratón y humano parece ser bastante similar; sin embargo, también existen diferencias significativas. Por ejemplo, en ratones, CD134 se expresa en Tefs después de la activación, mientras que CD134 se expresa constitutivamente en Tregs (Piconese et al. J Exp Med 2008; 205: 825-839). En seres humanos, CD134 se expresa tanto en Tefs como en Tregs pero solo después de la activación (véase más adelante, por ejemplo, Ejemplo 2 (g), ‘*expresión de CD134 en linfocitos T efectores y reguladores humanos después de la estimulación con perlas estimuladoras de anticuerpo anti-CD3 humano/anti CD28 humano*’). Además, las Tregs de ratón inducen a apoptosis de las Tefs de ratón para conseguir la supresión (Pandiyar et al. Nat Immunol 2007; 8: 1353; Scheffold et al. Nat Immunol 2007; 8: 1285-1287), mientras que las Tregs humanas no inducen a apoptosis en Tefs humanas para conseguir la supresión (Vercoulen et al. Plos ONE 2009; 4: e7183). Conjuntamente, estos datos indican funciones diferentes de CD134 en la función supresora de Tregs entre los sistemas inmunitarios de ser humano y de ratón.

La expresión “molécula de unión” incluye (1) un anticuerpo, (2) un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo y (3) un derivado de un anticuerpo, cada uno como se define en el presente documento. La expresión “se une a CD134” o “unión a CD134” se refiere a la unión de una molécula de unión, como se define en el presente documento, al receptor CD134 en un ensayo *in vitro*, tal como un ensayo BIAcore o por Octet (resonancia de plasmón superficial). Preferentemente, la molécula de unión tiene una afinidad de unión (K_d) de 1×10^{-6} M o menor, más preferentemente menor de 50×10^{-7} M, incluso más preferentemente menor que 1×10^{-7} M.

La expresión “anticuerpo aislado” o “molécula de unión aislada” se refiere a un anticuerpo o a una molécula de unión que: (1) no está asociada con componentes naturalmente asociados que la acompañan en su estado natural; (2) está libre de otras proteínas de la misma especie; (3) se expresa por una célula de diferente especie; o (4) no se produce en la naturaleza. Ejemplos de anticuerpos aislados incluyen un anticuerpo anti-CD134 que se ha purificado por afinidad usando CD134, un anticuerpo anti-CD134 que se ha generado por hibridomas u otras líneas celulares *in vitro* y un anticuerpo anti-CD134 humano derivado de un animal transgénico.

El término “agonista” se refiere a una molécula de unión, como se define en el presente documento, que después de la unión a CD134, (1) estimula o activa CD134, (2) potencia, promueve, induce, aumenta o prolonga la actividad, presencia o función de CD134, o (3) potencia, promueve, aumenta o induce la expresión de CD134. El término “antagonista” se refiere a una molécula de unión, como se define en el presente documento, que después de la unión a CD134, (1) inhibe o suprime CD134, (2) inhibe o suprime una actividad, presencia o función de CD134, o (3) inhibe o suprime la expresión de CD134.

El término “anticuerpo” se refiere a una molécula de inmunoglobulina que está típicamente compuesta de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena “pesada” (H) y una cadena “ligera” (L). Las cadenas ligeras humanas se

clasifican como kappa (κ) y lambda (λ). Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (en el presente documento se indica con la abreviatura HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. Las regiones constantes de cadena pesada de IgD, IgG e IgA comprenden tres dominios, CH1, CH2 y CH3 y las regiones constantes de cadena pesada de IgM e IgE comprenden cuatro dominios, CH1, CH2, CH3 y CH4. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (en el presente documento se indica con la abreviatura LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras). Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR, *Framework Regions*). Cada VH y VL comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi siguiendo el orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de cada par de cadena pesada/ligera (VH y VL), respectivamente, forman el sitio de unión del anticuerpo. La asignación de aminoácidos de cada región o dominio se realiza de acuerdo con las definiciones de las secuencias de Kabat de Proteínas de Interés Inmunológico (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)) o de acuerdo con las definiciones de Chothia et al. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions (Nature 1989; 342(6252): 877-83). El término “anticuerpo” incluye un anticuerpo que es una forma multimérica de anticuerpos, tales como dímeros, trímeros o multímeros de orden superior de anticuerpos monoméricos. También incluye un anticuerpo que está enlazado o unido a un resto que no es un anticuerpo. Adicionalmente, el término “anticuerpo” no está limitado por ningún método particular de producción del anticuerpo. Por ejemplo, el término incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes y anticuerpos policlonales.

La expresión “derivado de anticuerpo” o “derivado” de un anticuerpo se refiere a una molécula que puede unirse al mismo antígeno (es decir, CD134 humano) al cual se une el anticuerpo y comprende una secuencia de aminoácidos del anticuerpo unida a una entidad molecular adicional. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo que está contenida en el derivado de anticuerpo puede ser el anticuerpo de longitud completa, o puede ser cualquier parte, o partes, de un anticuerpo de longitud completa. La entidad molecular adicional puede ser una molécula biológica o química. Ejemplos de entidades moleculares adicionales incluyen grupos químicos, péptidos, proteínas (tales como enzimas, anticuerpos), aminoácidos y compuestos químicos. La entidad molecular adicional puede ser para su uso como un agente de detección, una etiqueta marcadora, un agente terapéutico o farmacéutico. La secuencia de aminoácidos de un anticuerpo puede estar

enlazada o unida a la entidad adicional por asociación no covalente, acoplamiento químico, fusión genética o de otra manera. La expresión “derivado de anticuerpo” también incluye anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y moléculas que derivan de modificaciones de las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo CD134, tal como

sustituciones, inserciones y adiciones conservativas de aminoácidos.

La expresión “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo se refiere a una o más partes de un anticuerpo de longitud completa que conserva la capacidad de unirse al mismo antígeno (es decir, CD134 humano) al cual se une el anticuerpo. La expresión “fragmento de unión a antígeno” también incluye una parte de un anticuerpo que es parte de una molécula más grande formada por asociación no covalente o covalente o de la parte de anticuerpo con una o más entidades moleculares adicionales. Ejemplos de entidades moleculares adicionales incluyen aminoácidos, péptidos o proteínas, tal como la región núcleo de estreptavidina, que puede usarse para crear una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov et al. Hum Antibodies Hybridomas 1995; 6(3): 93-101).

La expresión “anticuerpo quimérico” se refiere a un anticuerpo que comprende secuencias de aminoácidos derivadas de dos o más anticuerpos diferentes. Los dos o más anticuerpos diferentes pueden ser de la misma especie o de dos o más especies diferentes.

El término “epítopo” se refiere a la parte de un antígeno que puede unirse específicamente a un anticuerpo, o a un receptor de células T o, de otra manera, interaccionar con una molécula. En la técnica, un “epítopo” también se refiere a un “determinante antigénico”. Un epítopo generalmente consiste en un grupo de moléculas de superficie químicamente activas, tales como cadenas laterales de aminoácidos o hidratos de carbono o azúcar. Un epítopo puede ser “lineal” o “no lineal/ conformacional”. Una vez determinado un epítopo deseado (por ejemplo, por mapeo epitópico), pueden generarse anticuerpos contra ese epítopo. La generación y caracterización de anticuerpos también puede proporcionar información sobre epítopos deseables. A partir de esta información, después es posible explorar anticuerpos para aquellos que se unen al mismo epítopo, por ejemplo, realizando estudios de competencia cruzada para encontrar anticuerpos que se unan competitivamente con otro, es decir, los anticuerpos compiten por la unión al antígeno.

La expresión “célula hospedadora” se refiere a una célula en la cual se ha introducido un vector de expresión. El término no solo incluye la célula sujeto particular sino también la progenie de dicha célula. Dado que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones sucesivas debido a influencias ambientales o a mutación, es posible que dicha progenie no sea idéntica a la célula parental, pero no obstante se incluye en el alcance de la expresión “célula hospedadora”.

La expresión “anticuerpo humano” se refiere a un anticuerpo que consiste en secuencias de aminoácidos de secuencias de inmunoglobulina humana únicamente. Un anticuerpo humano puede contener cadenas carbohidrato murinas si se producen en un ratón, en una célula de ratón o en un linfoma derivado de una célula de ratón. Los

anticuerpos humanos pueden prepararse en una diversidad de formas conocidas en la técnica.

La expresión “anticuerpo humanizado” se refiere a un anticuerpo quimérico que contiene restos de aminoácidos derivados de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado puede contener alguna o todas las CDR de un anticuerpo animal no humano mientras que las regiones marco conservadas y las regiones constantes del anticuerpo contienen restos de aminoácidos derivados de secuencias de anticuerpos humanos.

El término “mamífero” se refiere a cualquier especie animal de la clase *Mammalian*. Ejemplos de mamíferos incluyen: seres humanos; animales de laboratorio, tales como, ratones, ratas, simios y cobayas; animales domésticos, tales como, conejos, ganado, ovejas, cabras, gatos, perros, caballos, cerdos y similares.

La expresión “ácido nucleico aislado” se refiere a una molécula de ácido nucleico de origen genómico, ADNc o sintético, o una combinación de los mismos, que está separada de otras moléculas de ácido nucleico presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Preferentemente, un ácido nucleico “aislado” está libre de secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico de interés en el ADN genómico del organismo del cual deriva el ácido nucleico.

La expresión constante de disociación (“*off-rate*”) o “ K_d ” se refiere a la constante de disociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular y se usa para describir la afinidad de unión entre un ligando (tal como un anticuerpo) y una proteína (tal como CD134). Cuando menor sea la constante de disociación en equilibrio, más estrechamente unido estará el ligando, o mayor será la afinidad entre el ligando y la proteína. Una K_d puede medirse mediante resonancia de plasmón superficial, por ejemplo usando el sistema BIACORE 1 u Octet. La expresión “anticuerpo anti-CD134” se refiere a un anticuerpo, como se define en el presente documento, capaz de unirse al CD134 humano.

Las expresiones “receptor de OX40” y “receptor de CD134” se usan indistintamente en la presente solicitud e incluyen el CD134 humano, así como variantes, isoformas y especies homólogas de los mismos. Por consiguiente, las moléculas de unión humanas descritas en el presente documento pueden, en algunos casos, unirse también a CD134 de especies distintas de seres humanos. En otros casos, las moléculas de unión pueden ser completamente específicas para el CD134 humano y pueden no presentar especies u otros tipos de reactividad cruzada. En particular, no se unirán bien al CD134 de ratón o rata.

La expresión “se une específicamente a CD134 humano” significa que la K_d de una molécula de unión para la unión a CD134 humano, es preferentemente más de 10 veces, 50 veces o, más preferentemente, más de 100 veces la K_d para su unión, por ejemplo, al CD40 humano, determinado usando un ensayo descrito en el presente documento, o conocido por un experto en la técnica (por ejemplo, un ensayo BIAcore). La determinación de que un agente particular se une específicamente al receptor OX40 puede realizarse de manera

alternativa fácilmente usando o adaptando procedimientos rutinarios. Un ensayo *in vitro* adecuado utiliza el procedimiento de transferencia de Western (descrito en muchos textos convencionales, incluyendo “Antibodies, A Laboratory Manual” de Harlow y Lane). Para determinar que un agente de unión al receptor OX40 determinado se une específicamente a la proteína OX40 humana, la proteína celular total se extrae de células de mamífero que no expresan el antígeno OX40, tal como una célula no linfocítica (por ejemplo, una célula COS o una célula CHO), transformada con una molécula de ácido nucleico que codifica OX40. Como un control negativo, la proteína celular total también se extrae de células no transformadas correspondientes. Estas preparaciones de proteína se someten después a electroforesis sobre un gel de poliacrilamida (PAGE) no desnaturizante o desnaturizante. Después de esto, las proteínas se transfieren a una membrana (por ejemplo, nitrocelulosa) por transferencia de Western, y el agente a ensayar se incuba con la membrana. Después de lavar la membrana para eliminar el agente no específicamente unido, la presencia de agente unido se detecta mediante el uso de un anticuerpo generado contra el agente de ensayo conjugado con un agente de detección, tal como la enzima fosfatasa alcalina; la aplicación del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato/nitro azul de tetrazolio da como resultado la producción de un compuesto azul denso por la fosfatasa alcalina inmunolocalizada. Los agentes que se unen específicamente al OX40 humano, mostrarán, mediante esta técnica, unirse a la banda de OX40 humano (que se localizará en una posición determinada sobre el gel determinada por su masa molecular) en el extracto de células transformadas OX40 mientras, que se observará una pequeña unión o ninguna en el extracto de células no transformadas. La unión no específica del agente con otras proteínas puede producirse y puede detectarse como una señal débil en las transferencias de Western. La naturaleza no específica de esta unión será reconocida por un experto en la técnica mediante la débil señal obtenida en la transferencia de Western con respecto a la fuerte señal primaria producida a partir de la unión específica del agente/proteína OX40 humana. De manera ideal, un agente de unión al receptor OX40 no se uniría a las proteínas extraídas de las células no transformadas. Además de ensayos de unión usando proteínas extraídas, supuestos agentes de unión a receptores OX40 pueden ensayarse para confirmar su capacidad de unirse sustancialmente solo al receptor OX40 *in vivo* conjugando el agente con una etiqueta fluorescente (tal como FITC) y analizando su unión a poblaciones de células T CD4+ activadas por antígeno y a poblaciones de linfocitos T no activadas por antígeno por Separación de Células Activada por Fluorescencia (FACS). Un agente que se une sustancialmente solo al receptor OX40 teñirá solamente las células T CD4+ activadas.

El término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otra molécula de ácido nucleico en una célula hospedadora. Ejemplos de vectores incluyen plásmidos, vectores virales, cósmidos o vectores de fago y vectores de ADN desnudo o vectores de expresión de ARN. Algunos vectores pueden ser capaces de replicarse de manera autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen. Algunos vectores pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora después de la introducción en la

célula hospedadora y por lo tanto replicarse junto con el genoma hospedador. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de genes con los cuales están unidos operativamente, y por lo tanto pueden recibir el nombre de “vectores de expresión”.

Como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso habitual.

La presente invención proporciona moléculas de unión aisladas que se unen al CD134 humano, incluyendo anticuerpos anti-CD134, fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos anti-CD134 y derivados de los anticuerpos anti-CD134. Las moléculas de unión se caracterizan por al menos una de las siguientes propiedades funcionales: (a) unirse al CD134 humano con una K_d de 1×10^{-6} M o menor y (b) no impedir la unión del receptor CD134 (OX40) humano con el ligando de OX40 (OX40L); (c) tener actividad agonista sobre el CD134 humano en células T efectoras y/o actividad antagonista sobre células T reguladoras en CD134 humano; (d) no unirse al receptor CD40 a una concentración de hasta 500 nM; (e) no unirse al receptor CD137 a concentraciones de hasta 500 nM; (f) no unirse al receptor CD271 a concentraciones de hasta 500 nM; (g) ser capaces de potenciar la producción de IL-2 mediante células T humanas aisladas; (h) ser capaces de potenciar la respuesta inmunitaria; (i) ser capaces de inhibir el crecimiento celular tumoral; y (j) tener efecto terapéutico sobre un cáncer. En algunas realizaciones la molécula de unión se une al CD134 humano con una K_d de 1×10^{-7} M o menor, o 1×10^{-8} M o menor, o $5 \times 1 \times 10^{-9}$ M o menor.

Los anticuerpos y otras moléculas de unión de la invención pueden prepararse mediante técnicas convencionales y después explorarse para identificar y obtener moléculas de unión que no impidan la unión de OX40L a CD134. Por ejemplo, pueden seleccionarse moléculas de unión que se unan a CD134 incluso cuando el CD134 se ha expuesto a una concentración de saturación de OX40L.

En una realización de la presente invención se proporciona un anticuerpo humano que se une a CD134. En algunas realizaciones, el anticuerpo humano es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al CD134 humano con una K_d de 100 nM o menor, preferentemente 10 nM o menor, y/o tiene actividad agonista sobre el CD134 humano de células T efectoras y/o actividad antagonista de células T reguladoras del CD134 humano. Un ejemplo de dichos anticuerpos humanos es el anticuerpo monoclonal humano, clon 12H3. La secuencia de aminoácidos de toda la región variable de cadena pesada y la secuencia de aminoácidos de las tres CDR de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo, clon 12H3, se muestra en las SEC ID Nos: 12 y 14-16, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de toda la región variable de cadena ligera y las secuencias de aminoácidos de las tres CDR de la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo, clon 12H3, se muestran en las SEC ID Nos: 13 y 17-19, respectivamente. Otro anticuerpo ilustrativo de la divulgación es el anticuerpo monoclonal humano, clon 20E5. La secuencia de aminoácidos de toda la región variable de cadena pesada y las secuencias de aminoácidos de las tres CDR de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo, clon 20E5, se muestran en las SEC ID Nos: 4 y 6-8, respectivamente. La secuencia de

aminoácidos de toda la región variable de cadena ligera y las secuencias de aminoácidos de las tres CDR de la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo, clon 20E5, se muestran en las SEC ID Nos: 5 y 9-11, respectivamente.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender una o más de estas CDR, una o más de estas CDR con 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos por CDR. Las sustituciones son preferentemente sustituciones conservativas. Las sustituciones conservativas proporcionan aminoácidos de funcionalidad similar y son bien conocidos en la técnica y se describen por ejemplo en la Tabla 1 del documento WO 2010/019702, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Dado que el clon 12H3 y el clon 20E5 se unen al CD134 humano, las secuencias VH y VL de cada uno de ellos pueden “mezclarse y emparejarse” con otros anticuerpos anti-CD134 para crear anticuerpos adicionales. La unión de dichos anticuerpos “mezclados y emparejados” con el CD134 humano pueden ensayarse usando los ensayos de unión conocidos en la técnica, incluyendo un ensayo descrito en los Ejemplos. En un caso, cuando las regiones VH y VL se mezclan y emparejan, una secuencia VH de un par VH/VL particular se reemplaza con una secuencia VH estructuralmente similar. Del mismo modo, en otro caso, una secuencia VL de un par VH/VL particular se reemplaza con una secuencia VL estructuralmente similar.

Las moléculas que contienen solo una o dos regiones CDR (en algunos casos incluso hasta una sola CDR o una parte de la misma, especialmente la CDR3) pueden conservar la actividad de unión a antígeno del anticuerpo de que deriva la CDR (o las CDR). Véase, por ejemplo, Laune et al. JBC 1997; 272: 30937-44; Monnet et al. JBC 1999; 274: 3789-96; Qiu et al. Nature Biotechnology 2007; 25: 921-9; Ladner et al. Nature Biotechnology 2007; 25: 875-7; Heap et al. J Gen Virol 2005; 86: 1791-1800; Nicaise et al. Protein Science 2004; 13: 1882-91; Vaughan and Sollazzo Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening 2001; 4:417-430; Quijcho Nature 1993; 362: 293-4; Pessi et al. Nature 1993; 362: 367-9; Bianchi et al. J Mol Biol 1994; 236: 649-59; y Gao et al. J Biol Chem 1994; 269: 32389-93.

Por consiguiente, una realización de la presente invención es un anticuerpo anti-CD134 humano aislado que comprende: (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 12; (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 13.

En una realización adicional de acuerdo con la invención se proporciona una molécula de unión a CD134 aislada que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 14; y/o (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 15; y/o (c) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 16.

En una realización adicional de acuerdo con la invención se proporciona una molécula de unión a CD134 aislada que comprende (a) una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17; y/o (b) una CDR2 de cadena

ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 18; y/o (c) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 19.

Por consiguiente, una realización de la presente invención es un anticuerpo anti-CD134 humano aislado que comprende: (a) una región variable de cadena pesada que
5 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4; (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 5.

En una realización adicional de acuerdo con la invención se proporciona una molécula de unión a CD134 aislada que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6; y/o (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7; y/o (c) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 8.

En una realización adicional de acuerdo con la invención se proporciona una molécula de unión a CD134 aislada que comprende (a) a una CDR1 de cadena ligera que
15 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 9; y/o (b) una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 10; y/o (c) una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11.

Dado que el clon 12H3 y el clon 20E5 se unen al CD134 humano y que la especificidad de la unión a antígeno se proporciona principalmente por las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de VH y las secuencias CDR1,
20 CDR2 y CDR3 de VL pueden “mezclarse y emparejarse” para crear anticuerpos anti-CD134 adicionales. Por ejemplo, las CDR de diferentes anticuerpos anti-CD134 pueden mezclarse y emparejarse, aunque cada anticuerpo típicamente contendrá una CDR1, CDR2 y CDR3 de VH y una CDR1, CDR2 y CDR3 de VL. La unión de dichos anticuerpos “mezclados y emparejados” con CD134 puede ensayarse usando los ensayos de unión
25 descritos anteriormente y en los Ejemplos (por ejemplo, análisis ELISA, Biacore). En un caso, cuando las secuencias CDR de VH se mezclan y emparejan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia VH particular se reemplaza con una o varias secuencias CDR estructuralmente similares. Del mismo modo, cuando las secuencias CDR de VL se mezclan y emparejan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia VL particular
30 típicamente se reemplaza con una o varias secuencias CDR estructuralmente similares. Será fácilmente obvio para un experto habitual en la técnica que puedan crearse nuevas secuencias VH y VL reemplazando una o más secuencias de la región CDR de VH y/o VL con secuencias estructuralmente similares a partir de las secuencias CDR descritas en el presente documento.

La clase (por ejemplo, IgG, IgM, IgE, IgA o IgD) y subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) de los anticuerpos anti-CD134 pueden determinarse mediante cualquier método adecuado tal como mediante ELISA o Transferencia de Western así como
35 otras técnicas. Como alternativa, la clases y subclase pueden determinarse secuenciando toda o una parte de los dominios constantes de las cadenas pesada y/o ligera de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos
40

conocidas de diversas clases y subclases de inmunoglobulinas y determinando las clases y subclases de los anticuerpos. Los anticuerpos anti-CD134 pueden ser una molécula de IgG, IgM, IgE, IgA, o IgD. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD134 pueden ser una IgG que es una subclase IgG1, IgG2, IgG3 o una IgG4. Por tanto, otro aspecto de la invención proporciona un método para convertir la clase o subclase de un anticuerpo anti-CD134 en otra clase o subclase.

Las moléculas de unión de acuerdo con una realización de la invención incluyen anticuerpos monoclonales, fragmentos de los mismos, péptidos y otras entidades químicas. Los anticuerpos monoclonales pueden crearse mediante el método convencional de inmunización de un mamífero, seguido del aislamiento de células B plasmáticas que producen los anticuerpos monoclonales de interés y fusión con una célula de mieloma.

En diversas realizaciones, en lugar de ser un anticuerpo real, el resto de unión puede ser una imitación de anticuerpo (por ejemplo, basado en un armazón que no es anticuerpo), un aptámero de ARN, una pequeña molécula o un CovX-body.

Se apreciará que las imitaciones de anticuerpo (por ejemplo, estructuras armazón que no son anticuerpo que tienen un alto grado de estabilidad que aún permiten introducir variabilidad en determinadas posiciones) pueden usarse para crear bibliotecas moleculares a partir de las cuales pueden derivar restos de unión. Los expertos habituales en la técnica de bioquímica conocerán muchas de dichas moléculas. Dichas moléculas pueden usarse como un resto de unión en el agente de la presente invención.

Las imitaciones de anticuerpos ejemplares se analizan en Skerra et al. (2007, Curr. Opin. Biotech., 18: 295-304) e incluyen: aficuerpos (denominados también Trinectinas; Nygren, 2008, FEBS J, 275, 2668-2676); CTLD (denominados también Tetranectinas; Innovations Pharmac. Technol. (2006), 27-30; adnectinas (denominadas también monocuerpos; Meth. Mol. Biol., 352 (2007), 95-109); anticalinas (Drug Discovery Today (2005), 10, 23-33); DARPin (anquirinas; Nat. Biotechnol. (2004), 22, 575-582); avímeros (Nat. Biotechnol. (2005), 23, 1556-1561); microcuerpos (FEBS J, (2007), 274, 86-95); aptámeros peptídicos (Expert. Opin. Biol. Ther. (2005), 5, 783-797); dominios Kunitz (J. Pharmacol. Exp. Ther. (2006) 318, 803-809); afillinas (Trends. Biotechnol. (2005), 23, 514-522).

Por consiguiente, se prefiere que la imitación de anticuerpo se seleccione del grupo que comprenda o que consista en aficuerpos, tetranectinas (CTLD), adnectinas (monocuerpos), anticalinas, DARPin (anquirinas), avímeros, iMabs, microcuerpos, aptámeros peptídicos, dominios Kunitz, aptámeros y afillinas.

Por “molécula pequeña” se entiende un compuesto orgánico de bajo peso molecular de 900 Dalton o menor. Aunque como “moléculas pequeñas” no se incluyen biopolímeros grandes, tales como, ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos (tales como almidón o celulosa), sus constituyentes monoméricos (ribo- o desoxirribonucleótidos, aminoácidos y monosacáridos, respectivamente) y oligoméricos (es decir polímeros cortos, tales como, dinucleótidos, péptidos, tales como, glutatión antioxidante y disacáridos tales como

sacarosa) si están incluidos. La producción de moléculas pequeñas se describe en Mayes y Whitcombe, 2005, Adv. Drug Deliv. Rev. 57: 1742-78 y en Root-Bernstein & Dillon, 2008, Curr. Pharm. Des. 14: 55-62.

Los *CovX-Bodies* se crean mediante unión covalente de un farmacóforo a través de un engarce al sitio de unión de un anticuerpo especialmente diseñado, reprogramando eficazmente el anticuerpo (Tryder et al., 2007, Bioorg. Med. Chem. Lett., 17:501-6). El resultado es que se forma una nueva clase de entidades químicas en donde cada componente contribuye a rasgos deseables en el *CovX-Body* intacto, en particular, la entidad tiene las acciones biológicas del péptido y la semivida prolongada del anticuerpo.

Pueden prepararse anticuerpos humanos mediante diversos métodos diferentes, incluyendo el uso de bibliotecas de expresión de inmunoglobulina humana (Stratagene Corp., La Jolla, California; Cambridge Antibody Technology Ltd., Londres, Inglaterra) para producir fragmentos de anticuerpos humanos (VH, VL, Fv, Fd, Fab o (Fab')₂), y el uso de estos fragmentos para construir anticuerpos humanos completos por fusión al mismo de la parte apropiada, usando técnicas similares a las de la producción de anticuerpos quiméricos. También pueden producirse anticuerpos humanos en ratones transgénicos con un genoma de inmunoglobulina humano. Dichos ratones se encuentran disponibles, por ejemplo, en Abgenix, Inc., Fremont, California, y Medarex, Inc., Annandale, Nueva Jersey. Además de conectar las regiones Fv de cadena pesada y ligera para formar un péptido monocatenario, el Fab puede construirse y expresarse por medios similares (M. J. Evans et al. J Immunol Meth 1995; 184: 123-138).

Los anticuerpos Delimmunized™ son anticuerpos en los que posiblemente se han eliminado epítomos de células T inmunogénicas, como se describe en la Solicitud de Patente Internacional PCT/GB98/01473. Por lo tanto, se espera que la inmunogenicidad en seres humanos se elimine o se reduzca sustancialmente cuando se apliquen *in vivo*. Las moléculas de unión de la invención, basadas en inmunoglobulina, pueden tener eliminados sus epítomos de células T inmunogénicas (si presentes) mediante dichos métodos.

Todos los anticuerpos completa y parcialmente humanos descritos anteriormente son menos inmunogénicos que los anticuerpos derivados no humanos o completamente murinos, al igual que los fragmentos y anticuerpos monocatenarios. Por lo tanto, es menos probable que todas estas moléculas (o sus derivados) susciten una respuesta inmunitaria o alérgica. Por consiguiente, se ajustan mejor a la administración *in vivo* en seres humanos que los anticuerpos completamente no humanos, especialmente cuando la administración se repite o es necesaria una administración prolongada.

Los anticuerpos biespecíficos pueden usarse como agentes de entrecruzamiento entre el CD134 humano de la misma célula diana humana, o el CD134 humano de dos células diana humanas diferentes. Dichos anticuerpos biespecíficos tienen una especificidad para cada uno de los dos epítomos diferentes del CD134 humano. Estos anticuerpos y el método para crearlos se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.534.254 (Creative Biomolecules, Inc.). Diferentes realizaciones de anticuerpos biespecíficos descritos en la

patente incluyen el ligamiento del Fv monocatenario con acopladores peptídicos, incluyendo Ser-Cys, (Gly)₄-Cys, (His)₆-(Gly)₄-Cys, agentes quelantes y acoplamientos químicos o disulfuro incluyendo bismaleimidohehexano y bismaleimidocaproilo.

Las moléculas que no son anticuerpos pueden aislarse o explorarse de bibliotecas de compuestos por medios convencionales. Un sistema automatizado para generar y explorar una biblioteca de compuestos se describe en las Patentes de Estados Unidos Nos 5.901.069 y 5.463.564. Una estrategia más centrada implica el modelado tridimensional del sitio de unión y después la creación de una familia de moléculas que se ajuste al modelo. Estas se exploran después para aquellas con características de unión óptimas.

Otra estrategia es generar bibliotecas de péptidos recombinantes y después explorar las que se unen al epítipo del CD134 humano de interés. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.723.322. Este epítipo es el mismo al que se unen los anticuerpos monoclonales descritos más adelante en los ejemplos. De hecho, una vez que se conoce el epítipo, las moléculas pueden generarse o aislarse con relativa facilidad de acuerdo con técnicas bien conocidas en la materia.

Una realización adicional proporciona derivados de cualquiera de los anticuerpos anti-CD134 como se ha descrito anteriormente. En un aspecto particular, el derivado de anticuerpo se deriva de modificaciones de las secuencias de aminoácidos del clon 12H3 y/o el clon 20E5. Las secuencias de aminoácidos de cualquier región de las cadenas de anticuerpo pueden estar modificadas, tales como regiones marco conservadas, regiones CDR o regiones constantes. Las modificaciones se pueden introducir mediante técnicas convencionales conocidas en la materia, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR aleatoria y pueden comprender aminoácidos naturales así como no naturales. Los tipos de modificaciones incluyen inserciones, deleciones, sustituciones o combinaciones de las mismas de uno o más aminoácidos de un anticuerpo anti-CD134. En algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos en las CDR de cadena pesada y/o una sustitución de aminoácido en las CDR de cadena ligera. En algunas realizaciones, un derivado de un anticuerpo anti-CD134 comprende una o más sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de línea germinal del gen humano. En una realización particular, una o más de estas sustituciones de línea germinal está en la región CDR2 de la cadena pesada. En otra realización particular, las sustituciones de aminoácidos con respecto a la línea germinal están en una o más de las mismas posiciones que las sustituciones en relación con la línea germinal en el clon 12H3 y el clon 20E5 de los anticuerpos. En otra realización, la sustitución de aminoácido es para cambiar una o más cisteínas en un anticuerpo a otro resto, tal como, sin limitación, alanina o serina. La cisteína puede ser una cisteína canónica o no canónica. La sustitución se puede realizar en una CDR o región marco conservada de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. Otro tipo de sustitución de aminoácidos es para eliminar pares de asparagina-glicina que forman potenciales sitios de desamidación alterando uno o ambos restos. En otras realizaciones más, la sustitución de

aminoácido es una sustitución de aminoácido conservativa. En una realización, el derivado de anticuerpo tiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones CDR de cadena pesada en relación con las secuencias de aminoácidos del clon 12H3 y/o el clon 20E5. Otro tipo de modificación de un anticuerpo anti-CD134 es la alteración del patrón de glucosilación original del anticuerpo. El término “alteración” se refiere a la deleción de uno o más restos de hidratos de carbono encontrados en el anticuerpo y/o adición de uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glucosilación de los anticuerpos típicamente está ligada a N. Ligada a N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un resto asparagina. Los ejemplos de otras modificaciones incluyen acilación, amidación, acetilación, entrecruzamiento, ciclación, formilación, hidroxilación, yodinación, metilación, miristoilación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, oxidación, fosforilación, prenilación, pegilación, procesamiento proteolítico y sulfación.

Otra realización proporciona un derivado de anticuerpo que comprende un anticuerpo anti-CD134 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento, unido a una entidad molecular adicional. Los ejemplos de entidades moleculares adicionales incluyen agentes farmacéuticos, péptidos o proteínas y agentes de detección o marcadores. Los ejemplos específicos de agentes farmacéuticos que pueden estar unidos a un anticuerpo anti-CD134 incluyen agentes citotóxicos u otros agentes terapéuticos contra el cáncer e isótopos radiactivos. Los ejemplos específicos de péptidos o proteínas que pueden estar unidos a un anticuerpo anti-CD134 incluyen anticuerpos que pueden ser el mismo anticuerpo anti-CD134 o un anticuerpo diferente. Los ejemplos específicos de agentes de detección o marcadores que pueden estar unidos a un anticuerpo anti-CD134 incluyen (1) compuestos fluorescentes, tales como fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-I-naftalenosulfonilo y fósforos de lantánido; (2) enzimas, tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, luciferasa y glucosa oxidasa; (3) biotina; (4) un epítipo de polipéptido predeterminado reconocido por un indicador secundario, tal como secuencias de pares de cremallera de leucina, dominios de unión a metal, marcadores epitópicos y sitios de unión para anticuerpos secundarios. Una realización adicional proporciona un derivado de anticuerpo que es una forma multimérica de un anticuerpo anti-CD134, tal como dímeros, trímeros o multímeros de orden superior de anticuerpo de anticuerpos monoméricos. Los monómeros individuales en un multímero de anticuerpo pueden ser idénticos o diferentes, es decir, pueden ser multímeros de anticuerpo heteroméricos u homoméricos. La multimerización de anticuerpos se puede conseguir a través de agregación natural. Por ejemplo, algún porcentaje de preparaciones de anticuerpo purificado (por ejemplo, moléculas de IgG1 purificadas) forman espontáneamente agregados de proteína que contienen homodímeros de anticuerpo y otros multímeros de anticuerpo de orden superior. Como alternativa se pueden formar los homodímeros de anticuerpo a través de técnica de

ligamiento químico conocidas en la materia. Los agentes de entrecruzamiento adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, tales como éster de m-maleimidobenzoyl-*N*-hidroxisuccinimida, tioacetato de *N*-succinimidil *S*-acetilo y succinimidil 4-(maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato) u homobifuncionales (tales como suberato de disuccinimidilo). Tales enlazadores están disponibles en el mercado. Los anticuerpos también se pueden preparar para multimerizarse a través de técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia.

Otra realización más proporciona un derivado de anticuerpo que es un anticuerpo quimérico, que comprende una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD134 humano que se ha descrito anteriormente en este documento. En otro ejemplo, todas las CDR del anticuerpo quimérico se derivan de anticuerpos anti-CD134 humano. En otro ejemplo, las CDR de más de un anticuerpo anti-CD134 humano se combinan en un anticuerpo quimérico. Además, un anticuerpo quimérico puede comprender las regiones marco conservadas derivadas de un anticuerpo anti-CD134 humano y una o más CDR de uno o más anticuerpos humanos diferentes. Se pueden generar anticuerpos quiméricos usando métodos convencionales conocidos en la técnica. En algunas realizaciones particulares, el anticuerpo quimérico comprende una, dos o tres CDR de la región variable de cadena pesada o de la región variable de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del clon 12H3 y/o clon 20E5 del anticuerpo.

Los ejemplos de otros derivados de anticuerpo provistos por la presente invención incluyen anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, anticuerpos de dominio, nanocuerpos y unicuerpos (unibody). En realizaciones preferidas, los anticuerpos monoclonales pueden ser anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos DeImmunized™, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos, incluyendo Fab, F(ab')₂, Fv u otros fragmentos que conservan la función de unión a antígeno del anticuerpo precursor. Los anticuerpos de cadena sencilla ("ScFv") y el método de su construcción están descritos en la Patente de Estados Unidos Nº 4.946.778.

Un "anticuerpo de cadena sencilla" (scFv) consiste en una única cadena polipeptídica que comprende un dominio VL unido a un dominio VH donde el dominio VL y el dominio VH están emparejados para formar una molécula monovalente. Se puede preparar un anticuerpo de cadena sencilla según el método conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Bird et al., (1988) Science 242: 423-426 y Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Un "diacuerpo" consiste en dos cadenas, comprendiendo cada cadena una región variable de cadena pesada conectada a una región variable de cadena ligera en la misma cadena polipeptídica conectadas mediante un enlazador peptídico corto, donde las dos regiones en la misma cadena no se emparejan entre sí pero con dominios complementarios de la otra cadena para formar una molécula biespecífica. En la técnica son conocidos métodos de preparación de diacuerpos (véase, por ejemplo, Holliger P. et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448, y Poljak R. J. et al., (1994) Structure 2: 1121-1123). Los anticuerpos de dominio (dAb) son pequeñas unidades de

unión funcionales de anticuerpos correspondientes a regiones variables de las cadenas pesada o ligera de anticuerpos. Los anticuerpos de dominio se expresan bien en sistemas de células bacterianas, de levadura y de mamífero. Son conocidos detalles adicionales de los anticuerpos de dominio y los métodos de producción de los mismos en la técnica (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.291.158; 6.582.915; 6.593.081; documentos WO04/003019 y WO03/002609). Los nanocuerpos se derivan de las cadenas pesadas de un anticuerpo. Un nanocuerpo comprende típicamente un dominio variable sencillo y dos dominios constantes (CH2 y CH3) y conservan la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo original. Se pueden preparar nanocuerpos mediante métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.765.087, la Patente de Estados Unidos N° 6.838.259, documento WO 06/079372). Los unicuerpos consisten en una cadena ligera y una cadena pesada de un anticuerpo IgG4. Los unicuerpos se pueden preparar mediante la eliminación de la región bisagra de anticuerpos IgG4. Se pueden encontrar detalles adicionales de unicuerpos y de métodos de preparación de los mismos en el documento WO2007/059782.

Además del resto de unión, las moléculas de la invención pueden comprender además un resto para aumentar la semivida *in vivo* de la molécula, tal como, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), albúmina sérica humana, grupos de glucosilación, ácidos grasos y dextrano. Tales restos adicionales pueden conjugarse o combinarse de otro modo con el resto de unión usando métodos bien conocidos en la técnica.

Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de una molécula de unión a CD134 según el primer aspecto de la invención. La secuencia de aminoácidos codificada por la molécula de ácido nucleico puede ser cualquier parte de un anticuerpo intacto, tal como una CDR, una secuencia que comprende una, dos o tres CDR o una región variable de una cadena pesada o una cadena ligera o puede ser una cadena pesada o una cadena ligera completa. En unas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos que comprende (1) una región CDR3, en particular una región CDR3 de cadena pesada del clon 12H3 y/o clon 20E5 de anticuerpos; (2) una región variable de una cadena pesada o una región variable de una cadena ligera del clon 12H3 y/o clon 20E5 de los anticuerpos; o (3) una cadena pesada o una cadena ligera del clon 12H3 y/o clon 20E5 de los anticuerpos. En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 o del grupo que consiste en la SEC ID N°: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11.

Las moléculas de ácido nucleico provistas por la divulgación se pueden obtener de cualquier fuente que produzca un anticuerpo CD134 según la invención. Se puede aislar el ARNm de células productoras de anticuerpo anti-CD134 mediante técnicas convencionales, clonarse y/o amplificarse usando PCR y técnicas de construcción de genotecas y explorarse usando protocolos convencionales para obtener moléculas de ácido nucleico que codifican una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD134. Se puede usar el ARNm para

producir ADNc para su uso en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o clonación de ADNc de genes de anticuerpos. En una realización, la molécula de ácido nucleico se obtiene de un hibridoma que expresa un anticuerpo anti-CD134, tal como se ha descrito anteriormente, con preferencia un hibridoma que tiene como uno de sus compañeros de fusión una célula de animal transgénico no humano que expresa genes de inmunoglobulina humana. En otra realización, el hibridoma se obtiene de un animal no transgénico no humano.

Una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD134 se puede construir fusionando una molécula de ácido nucleico que codifica la región variable pesada con una molécula de ácido nucleico que codifica una región constante de una cadena pesada. De manera similar, una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-CD134 se puede construir fusionando una molécula de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera con una molécula de ácido nucleico que codifica una región constante de una cadena ligera. Las moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena VH y VL se pueden convertir en genes de anticuerpo de longitud completa insertando las mismas en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y regiones constantes de cadena ligera, respectivamente, de tal manera que el segmento VH está unido operativamente al segmento o los segmentos de región constante de cadena pesada (CH) en el vector y el segmento VL está unido operativamente al segmento de región constante de cadena ligera (CL) en el vector. Como alternativa, las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas VH o VL se convierten en genes de anticuerpo de longitud completa mediante unión, por ejemplo, ligamiento de la molécula de ácido nucleico que codifica una cadena VH con una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena CH usando técnicas de biología molecular convencionales. Lo mismo se puede conseguir usando moléculas de ácido nucleico que codifiquen cadenas VL y CL. Entonces se pueden expresar moléculas de ácido nucleico que codifiquen las cadenas pesada y/o ligera completas de una célula en la que se han introducido y se puede aislar el anticuerpo anti-CD134.

Las moléculas de ácido nucleico se pueden usar para expresar de manera recombinante grandes cantidades de anticuerpos anti-CD134, como se describe a continuación. Las moléculas de ácido nucleico se pueden usar también para producir otras moléculas de unión provistas por la divulgación, tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, inmunoadhesinas, diacuerpos, anticuerpos mutados y derivados de anticuerpos, como se describe a lo largo del presente documento. En una realización se usa una molécula de ácido nucleico como sonda o como cebador de PCR para secuencias específicas de anticuerpo. Por ejemplo, se puede usar una sonda de molécula de ácido nucleico en métodos de diagnóstico o un cebador de PCR de molécula de ácido nucleico se puede usar para amplificar regiones de ADN que se podrían usar, entre otras cosas, para aislar secuencias de ácido nucleico para su uso en la producción de regiones variables de los anticuerpos anti-CD134.

Una vez que se obtienen las moléculas de ADN que codifican los segmentos VH y VL de un anticuerpo anti-CD134, estas moléculas de ADN se pueden manipular adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los genes de región variable en genes de cadena de anticuerpo completa, en genes de fragmento Fab o en un gen de scFv.

Otro aspecto de la invención proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico descrita anteriormente en el presente documento. La molécula de ácido nucleico puede codificar una parte de una cadena ligera o cadena pesada (tal como una CDR o región variable), una cadena ligera o pesada completa, un polipéptido que comprende una parte o una totalidad de una cadena pesada o ligera o una secuencia de aminoácidos de un derivado de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

Un ejemplo de un vector de expresión adecuado es uno que codifica una secuencia de inmunoglobulina CH o CL humana funcionalmente completa con sitios de restricción apropiados modificados mediante ingeniería genética de tal manera que se puede insertar y expresar cualquier secuencia de VH o VL. El vector de expresión también puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de la secuencia de aminoácidos de la cadena de anticuerpo de una célula hospedadora. El ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de una cadena de anticuerpo se puede clonar en el vector de tal manera que el péptido señal esté ligado en fase con el extremo amino de la secuencia de aminoácidos de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína que no es inmunoglobulina). Además de la secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD134 (genes de cadena de anticuerpo), los vectores de expresión llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula hospedadora. El diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseado, etc. Las secuencias reguladoras para la expresión de células hospedadoras de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de LTR retrovirales, citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/potenciador de CMV), Virus de Simio 40 (SV40) (tales como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)), promotores de polioma y de mamífero fuertes tales como promotores de inmunoglobulina nativa y de actina.

La célula hospedadora puede ser una célula de mamífero, de insecto, vegetal, bacteriana o de levadura. Los ejemplos de líneas celulares de mamífero adecuadas como células hospedadoras incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células NSO, células PER-C6, células SP2, células HEK-293T, células NIH-3T3, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono verde africano (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células de pulmón humanas,

células A549 y varias líneas celulares diferentes. Los ejemplos de líneas celulares de insecto incluyen Sf9 o Sf21. Los ejemplos de células hospedadoras vegetales incluyen Nicotiana, Arabidopsis, lenteja de agua, cereales, trigo, patata, etc. Las células hospedadoras bacterianas incluyen las especies *E. coli* y *Streptomyces*. Los ejemplos de células hospedadoras de levadura incluyen *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

Las secuencias de aminoácidos de una molécula de unión expresadas por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos pueden tener una glucosilación diferente. Sin embargo, todas las moléculas de unión codificadas por las moléculas de ácido nucleico provistas en el presente documento o que comprenden las secuencias de aminoácidos provistas en el presente documento son parte de la presente invención, sin tener en cuenta la glucosilación de las moléculas de unión.

Otro aspecto de la invención proporciona un método para la producción de una molécula de unión a CD134 como se ha definido anteriormente usando presentación en fagos. El método comprende (a) sintetizar una genoteca de anticuerpos humanos en un fago, (b) explorar la genoteca con el CD134 o una parte del mismo, (c) aislar el fago que se une al CD134 o una parte del mismo y (d) obtener el anticuerpo del fago. Un método ilustrativo para preparar la genoteca de anticuerpos comprende la etapa de: (a) inmunizar un animal no humano que comprende loci de inmunoglobulina humana con CD134 o una parte antigénica del mismo para crear una respuesta inmunitaria; (b) extraer células productoras de anticuerpo del animal inmunizado; (c) aislar el ARN que codifica las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos anti-CD134 de las células extraídas; (d) realizar la transcripción inversa del ARN para producir ADNc; (e) amplificar el ADNc; y (f) insertar el ADNc en un vector de presentación en fagos, de tal manera que se expresen los anticuerpos en el fago. Se pueden aislar anticuerpos anti-CD134 humano recombinantes o fragmentos de unión a antígeno de los mismos explorando una genoteca de anticuerpos combinatoria recombinante. La genoteca puede ser una genoteca de presentación en fagos de scFv generado usando ADNc de VL y VH humano preparados a partir de ARNm aislados de células B. En la técnica son conocidos métodos para preparar y explorar tales genotecas. Están disponibles en el mercado los kits para generar genotecas de presentación en fagos.

En una realización preferida según la invención se proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene una o una combinación de moléculas de unión como se describe en el presente documento y, opcionalmente, un transportador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones se pueden preparar mediante métodos convencionales conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, la composición comprende un anticuerpo anti-CD134 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En una realización particular, la composición comprende un clon 12H3 y/o clon 20E5 de anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de cualquier anticuerpo. En otras realizaciones más, la composición comprende un derivado del clon 12H3 y/o clon 20E5 de anticuerpo. La expresión “transportador farmacéuticamente aceptable” se refiere a

cualquier sustancia inactiva que sea adecuada para su uso en una formulación para el suministro de una molécula de unión. Un transportador puede ser un antiadherente, aglutinante, agente de recubrimiento, disgregante, carga o diluyente, conservante (tal como un antioxidante, agente antibacteriano o antifúngico), edulcorante, agente de retardo de la absorción, agente humectante, agente emulsionante, tampón y similares.

Las moléculas no peptídicas de la invención se pueden administrar por vía oral, incluyendo por suspensión, comprimidos y similares. Las formulaciones líquidas se pueden administrar mediante inhalación de microcápsulas liofilizadas o aerosolizadas. Se pueden usar también supositorios. Se pueden usar vehículos farmacéuticos adicionales para controlar la duración de acción de las moléculas de la invención. La dosificación y la programación para la formulación que se seleccione se pueden determinar mediante procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica. Tales procedimientos implican extrapolar un programa de dosificación estimado de modelos animales y determinar después la dosificación óptima en un estudio de búsqueda de dosis clínico humano.

Las composiciones pueden estar en cualquier forma adecuada, tal como formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas. Las diversas formas de dosificación de las composiciones se pueden preparar mediante técnicas convencionales conocidas en la materia.

La cantidad relativa de una molécula de unión incluida en la composición variará dependiendo de varios factores, tales como las características deseadas de liberación y farmacodinámicas, la molécula de unión específica y los transportadores usados y la forma de dosificación. La cantidad de una molécula de unión en una única forma de dosificación generalmente será la cantidad que produzca un efecto terapéutico, pero también puede ser una cantidad menor. Generalmente, esta cantidad variará de aproximadamente el 0,001 por ciento a aproximadamente el 99 por ciento, de aproximadamente el 0,1 por ciento a aproximadamente el 70 por ciento, o de aproximadamente el 1 por ciento a aproximadamente el 30 por ciento con respecto al peso total de la forma de dosificación.

Además de la molécula de unión se pueden incluir uno o más agentes terapéuticos adicionales en la composición o por separado como parte del mismo régimen de tratamiento. Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales se describen más adelante en el presente documento. La cantidad adecuada del agente terapéutico adicional a incluir en la composición se puede seleccionar con facilidad por un experto en la materia y variará dependiendo de varios factores, tales como el agente particular y los transportadores usados, la forma de dosificación y las propiedades de liberación y farmacodinámicas deseadas. La cantidad del agente terapéutico adicional incluido en una forma de dosificación única generalmente será aquella cantidad del agente que produzca un efecto terapéutico, pero puede ser también una cantidad menor.

Las moléculas de unión y las composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de unión proporcionada por la presente divulgación son útiles con fines

terapéuticos, de diagnóstico u otros, tales como aumentar una respuesta inmunitaria, tratar cáncer, potenciar la eficacia de otra terapia contra el cáncer o aumentar la eficacia de vacunas y tienen varias utilidades, tales como para su uso como medicamentos o agentes de diagnóstico. Por tanto, en un aspecto preferido de la invención se proporcionan métodos de uso de las moléculas de unión o de composiciones farmacéuticas.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para la modulación de respuestas inmunitarias anti-tumorales mediadas por CD134 humano, incluyendo el aumento de la función efectora de Tefs humanos que expresan CD134 humano y/o la atenuación de la función supresora de Tregs humanos que expresan CD134 humano usando moléculas de unión que se unen a CD134 humano, incluyendo anticuerpos anti-CD134 humano, que (1) evitan la interacción de OX40L humano de origen natural con el receptor CD134 humano y/o (2) no bloquean la señalización celular mediada por CD134 humano después de la ocupación con su OX40L humano de origen natural.

Otro aspecto de la invención proporciona un método de modulación de las respuestas inmunitarias anti-tumorales mediadas por CD134 humano, por lo que dicho método no incluye moléculas de unión que se unen a CD134 humano, incluyendo anticuerpos anti-CD134 humano, tales como miméticos de OX40L humano que interaccionan con el dominio de unión a OX40L humano en el receptor CD134 humano y/o bloquean la señalización celular de OX40L humano-CD134 humano.

La presente invención desvela moléculas de unión que se unen a CD134 humano, incluyendo anticuerpos anti-CD134 humano, para fines terapéuticos anti-tumorales. Los anticuerpos anti-CD134 humano se unen al dominio extracelular de CD134 humano. Más específicamente, los anticuerpos anti-CD134 humano se unen a regiones que no se unen a OX40L (es decir, los anticuerpos anti-CD134 humano no bloquean por completo la unión de OX40L humano a CD134 humano) en el dominio extracelular de CD134 humano en Tefs humanos y Tregs humanos activados.

En un aspecto particular se proporcionan métodos para aumentar la respuesta inmunitaria en un mamífero que comprenden administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la molécula de unión es un anticuerpo anti-CD134 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y el mamífero es un ser humano. En otra realización, la molécula de unión es un clon 12H3 y/o clon 20E5 de anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de cualquier anticuerpo. La expresión “aumentar la respuesta inmunitaria” se refiere a estimular, provocar, aumentar, mejorar o ampliar cualquier respuesta del sistema inmunitario de un mamífero. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta celular (es decir, mediada por células, tal como mediada por linfocitos T citotóxicos) o una respuesta humoral (es decir, respuesta mediada por anticuerpos) y puede ser una respuesta inmunitaria primaria o secundaria. Los ejemplos del aumento de la respuesta inmunitaria incluyen actividad de células T auxiliares CD4+ aumentada y generación de células T citolíticas. Se puede evaluar el aumento de la

respuesta inmunitaria usando varias mediciones *in vitro* o *in vivo* conocidas por los expertos en la materia incluyendo, pero sin limitación, ensayos de linfocitos T citotóxicos, liberación de citocinas (por ejemplo, producción de IL-2), regresión de tumores, supervivencia de animales portadores de tumores, producción de anticuerpos, proliferación de células inmunitarias, expresión de marcadores de superficie celular y citotoxicidad. En una realización, el método aumenta una respuesta inmunitaria celular, en particular una respuesta de células T citotóxicas.

Un aspecto de la invención proporciona una molécula de unión que se une a CD134 humano, donde a o por encima de la concentración de saturación de dicha molécula de unión, el efecto en la unión de OX40L a CD134 está reducido no más del 70 %, en células T que expresan CD134 humano, como se mide mediante un ensayo de citometría de flujo basado en fluorescencia, como se describe en el Ejemplo 2(f). Más preferentemente, el efecto en la unión de OX40L a CD134 está reducido no más de aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 50 %, o aproximadamente el 40 %, o aproximadamente el 30 %, o aproximadamente el 20 %, o aproximadamente el 10 % o menos, o preferentemente no hay reducción en absoluto en la unión.

Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de unión en la que a una concentración de 70 nM de la molécula de unión, el efecto en la unión de OX40L a CD134 está reducido no más del 70 % en células T que expresan CD134 humano, como se mide mediante un ensayo de citometría de flujo basado en fluorescencia, como se describe en Ejemplo 2(f). Más preferentemente, el efecto en la unión de OX40L a CD134 está reducido no más de aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 50 %, o aproximadamente el 40 %, o aproximadamente el 30 %, o aproximadamente el 20 %, o aproximadamente el 10 % o menos, o preferentemente no hay reducción en absoluto de la unión.

Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de unión que compite por la unión a CD134 humano con un anticuerpo que comprende (1) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 12 y (2) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 13, como se muestra mediante competición cruzada entre una de dichas moléculas de unión no marcadas y uno de dichos anticuerpos marcados con fluorescencia en linfocitos T que expresan CD134 humano estimulados con PHA, como se mide mediante citometría de flujo (descrito posteriormente en el Ejemplo 2(e)). Preferentemente, la unión del dicho anticuerpo, a o por encima de su concentración de saturación está reducida al menos aproximadamente el 50 %, o aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 70 %, o aproximadamente el 80 %, o aproximadamente el 90 % o más, y preferentemente está anulada cuando se ensaya mediante competición cruzada frente a dicha molécula de unión.

Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de unión que compite por la unión a CD134 humano con un anticuerpo que comprende (1) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4 y (2) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID

Nº: 5, como se muestra mediante la competición cruzada entre una de dichas moléculas de unión no marcadas y uno de dichos anticuerpos marcados con fluorescencia en linfocitos T que expresan CD134 humano estimulados con PHA como se mide mediante citometría de flujo (descrito posteriormente en el Ejemplo 2(e)). Preferiblemente, la unión de dicho anticuerpo, a o por encima de su concentración de saturación, está reducida en al menos aproximadamente el 50 %, o aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 70 %, o aproximadamente el 80 %, o aproximadamente el 90 % o más, y preferentemente está anulada cuando se ensaya mediante competición cruzada frente a dicha molécula de unión.

Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de unión que se une a CD134 humano, en la que el efecto en la unión de OX40L a CD134 en células T que expresan CD134 humano está reducido en no más de aproximadamente el 70 %, o aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 50 %, o aproximadamente el 40 %, o aproximadamente el 30 %, o aproximadamente el 20 %, o aproximadamente el 10 % o menos y donde dicha molécula de unión adicionalmente no impide las respuestas inmunoestimulantes y/o proliferativas de OX40L humano en células efectoras T que expresan CD134 humano.

Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de unión que se une a CD134 humano, donde la molécula de unión no evita la unión del receptor CD134 humano (OX40) al ligando de OX40 (OX40L) y donde dicha molécula de unión además no impide las respuestas inmunoestimulantes y/o proliferativas de OX40L humano en las células efectoras T que expresan CD134 humano.

Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de unión que se une a CD134 humano, donde el efecto en la unión de OX40L a CD134 en células T que expresan CD134 humano está reducido en no más de aproximadamente el 70 %, o aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 50 %, o aproximadamente el 40 %, o aproximadamente el 30 %, o aproximadamente el 20 %, o aproximadamente el 10 % o menos, y donde dicha molécula de unión aumenta las respuestas inmunoestimulantes y/o proliferativas de OX40L humano sobre células efectoras T que expresan CD134 humano.

Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de unión que se une a CD134 humano, donde la molécula de unión no evita la unión del receptor CD134 humano (OX40) al ligando de OX40 (OX40L) y donde dicha molécula de unión aumenta las respuestas inmunoestimulantes y/o proliferativas de OX40L humano en células efectoras T que expresan CD134 humano.

Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de unión que se une a CD134 humano, donde el efecto en la unión de OX40L a CD134 en células T humanas que expresan CD134 humano está reducido en no más de aproximadamente el 70 %, o aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 50 %, o aproximadamente el 40 %, o aproximadamente el 30 %, o aproximadamente el 20 %, o aproximadamente el 10 % o menos y donde dicha molécula de unión además no impide las respuestas de función supresora de OX40L humano en células reguladoras T que expresan CD134 humano.

Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de unión que se une a CD134 humano, donde la molécula de unión no evita la unión del receptor CD134 humano (OX40) al ligando de OX40 (OX40L) y donde dicha molécula de unión además no impide las respuestas de función supresora de OX40L humano sobre células reguladoras T que expresan CD134 humano.

Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de unión que se une a CD134 humano, donde el efecto en la unión de OX40L a CD134 en células T humanas que expresan CD134 humano está reducido en no más de aproximadamente el 70 %, o aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 50 %, o aproximadamente el 40 %, o aproximadamente el 30 %, o aproximadamente el 20 %, o aproximadamente el 10 % o menos y donde dicha molécula de unión aumenta las respuestas de función supresora de OX40L humano sobre células reguladoras T que expresan CD134 humano.

Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de unión que se une a CD134 humano, donde la molécula de unión no evita la unión del receptor CD134 humano (OX40) al ligando de OX40 (OX40L) y donde dicha molécula de unión aumenta las respuestas de función supresora de OX40L humano sobre células reguladoras T que expresan CD134 humano.

Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de unión que se une a CD134 humano, donde el efecto en la unión de OX40L a CD134 en células T que expresan CD134 humano está reducido en no más de aproximadamente el 70 %, o aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 50 %, o aproximadamente el 40 %, o aproximadamente el 30 %, o aproximadamente el 20 %, o aproximadamente el 10 % o menos y donde dicha molécula de unión además no impide las respuestas proliferativas de OX40L humano sobre células reguladoras T que expresan CD134 humano.

Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de unión que se une a CD134 humano, donde la molécula de unión no inhibe o evita la unión del receptor CD134 humano (OX40) al ligando de OX40 (OX40L) y donde dicha molécula de unión además no impide las respuestas proliferativas de OX40L humano sobre células reguladoras T que expresan CD134 humano.

Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de unión que se une a CD134 humano, donde el efecto en la unión de OX40L a CD134 en células T que expresan CD134 humano está reducido en no más de aproximadamente el 70 %, o aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 50 %, o aproximadamente el 40 %, o aproximadamente el 30 %, o aproximadamente el 20 %, o aproximadamente el 10 % o menos y donde dicha molécula de unión inhibe las respuestas proliferativas de OX40L humano sobre células reguladoras T que expresan CD134 humano.

Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de unión que se une a CD134 humano, donde la molécula de unión no inhibe o evita la unión del receptor CD134 humano (OX40) al ligando de OX40 (OX40L) y donde dicha molécula de unión inhibe las respuestas proliferativas de OX40L humano sobre las células reguladoras T que expresan

CD134 humano.

Se describe del siguiente modo un método adecuado para medir la unión simultánea de OX40L y el anticuerpo anti-CD134. La señal fluorescente de FITC (intensidad de fluorescencia geomedia o media (MFI)) de la unión de OX40L humano en PBMC que expresan CD134 humano estimuladas con PHA en ausencia de anticuerpo anti-CD134 humano se ajusta en el 100 %. La señal de fluorescencia de PE (MFI) de la unión de anticuerpo anti-CD134 humano a PBMC que expresan CD134 humano estimuladas con PHA en ausencia de OX40L humano se ajusta en el 100 %. La reducción de esta señal de fluorescencia de FITC y señal de fluorescencia de PE cuando se añaden simultáneamente tanto OX40L humano como anticuerpo anti-CD134 humano a PBMC que expresan CD134 humano estimuladas con PHA preferentemente no supera aproximadamente el 70 %, o aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 50 %, o aproximadamente el 40 %, o aproximadamente el 30 %, o aproximadamente el 20 %, o aproximadamente el 10 % o menos.

Un método adecuado para medir la ausencia del impedimento sobre las respuestas proliferativas mediadas por OX40L de Tefs es el siguiente. La incorporación de timidina tritiada o BrdU en Tefs que expresan CD134 humano después del tratamiento con OX40L humano se ajusta en el 100 %. El cambio (es decir, disminución o aumento) de esta incorporación de timidina tritiada o BrdU cuando se añaden simultáneamente tanto OX40L humano como anticuerpo anti-CD134 humano a Tefs que expresan CD134 humano activadas (por ejemplo, estimuladas con PHA o estimuladas con perlas anti-CD3/anti-CD28) preferentemente no supera aproximadamente el 30 %, o aproximadamente el 20 %, o aproximadamente el 10 % o menos.

Un método adecuado para medir el aumento de las respuestas proliferativas mediadas por OX40L de Tefs es el siguiente. La incorporación de timidina tritiada o BrdU en Tefs que expresan CD134 humano después del tratamiento con OX40L humano se ajusta en el 100 %. El aumento de esta incorporación de timidina tritiada o BrdU cuando se añaden simultáneamente tanto OX40L humano como anticuerpo anti-CD134 humano a Tefs que expresan CD134 humano activadas (por ejemplo, estimuladas con PHA o estimuladas con perlas anti-CD3/anti-CD28) preferentemente es mayor de aproximadamente el 30 %, o aproximadamente el 40 %, o aproximadamente el 50 %, o aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 70 % o más.

Un método adecuado para medir la ausencia del impedimento de la función de supresión mediada por OX40L de Tregs es el siguiente. La incorporación de timidina tritiada o de BrdU en Tefs que expresan CD134 humano que se co-cultivan con Tefs que expresan CD134 humano (por ejemplo, proporción Tef/Treg = 1:1), después del tratamiento con OX40L se ajusta al 100 %. El cambio (es decir, disminución o aumento) de esta incorporación de timidina tritiada o BrdU cuando se añaden simultáneamente tanto OX40L humano como anticuerpo anti-CD134 humano a Tefs que expresan CD134 humano activadas (por ejemplo, estimuladas con PHA o estimuladas con perlas anti-CD3/anti-

CD28) que se co-cultivan con Tefs que expresan CD134 humano (por ejemplo, proporción Tef/Treg = 1:1) preferentemente no supera aproximadamente el 30 %, o aproximadamente el 20 %, o aproximadamente el 10 % o menos.

Un método adecuado para medir el aumento de la función de supresión mediada por OX40L de Tregs es el siguiente. La incorporación de timidina tritiada o BrdU en Tefs que expresan CD134 humano, que se co-cultivan con Tefs que expresan CD134 humano (por ejemplo, proporción Tef/Treg = 1:1) después del tratamiento con OX40L humano se ajustan al 100 %. El aumento de esta incorporación de timidina tritiada o BrdU cuando se añaden simultáneamente tanto OX40L humano como anticuerpo anti-CD134 humano a Tefs que expresan CD134 humano activadas (por ejemplo, estimuladas con PHA o estimuladas con perlas anti-CD3/anti-CD28), que se co-cultivan con Tefs que expresan CD134 humano (por ejemplo, proporción Tef/Treg = 1:1) preferentemente es mayor de aproximadamente el 30 %, o aproximadamente el 40 %, o aproximadamente el 50 %, o aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 70 % o más.

Un método adecuado para medir la ausencia de impedimento de las respuestas proliferativas mediadas por OX40L de Tregs es el siguiente. La incorporación de timidina tritiada o BrdU en Tregs que expresan CD134 humano después del tratamiento con OX40L humano se ajusta al 100 %. El cambio (es decir, disminución o aumento) de esta incorporación de timidina tritiada o BrdU cuando se añaden simultáneamente tanto OX40L humano como anticuerpo anti-CD134 humano a Tregs que expresan CD134 humano activadas (por ejemplo, estimuladas con PHA o estimuladas con perlas anti-CD3/anti-CD28) preferentemente no supera aproximadamente el 30 %, o aproximadamente el 20 %, o aproximadamente el 10 % o menos.

Un método adecuado para medir la inhibición de las respuestas proliferativas mediadas por OX40L de Tregs es el siguiente. La incorporación de timidina tritiada o BrdU en Tregs que expresan CD134 humano después del tratamiento con OX40L humano se ajusta al 100 %. La reducción de esta incorporación de timidina tritiada o BrdU cuando se añaden simultáneamente tanto OX40L humano como anticuerpo anti-CD134 humano a Tregs que expresan CD134 humano activadas (por ejemplo, estimuladas con PHA o estimuladas con perlas anti-CD3/anti-CD28) preferentemente es mayor de aproximadamente el 30 %, o aproximadamente el 40 %, o aproximadamente el 50 %, o aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 70 % o más.

Otro aspecto de la invención proporciona un método de tratamiento de cáncer en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión como se describe en el presente documento.

En otra realización preferida de la invención, la molécula de unión es un clon 12H3 y/o clon 20E5 de anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de cualquier anticuerpo. En otra realización, el mamífero es un ser humano.

En otra realización preferida de la invención se proporciona un método de prevención de cáncer en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad

terapéuticamente eficaz de una molécula de unión como se describe en el presente documento.

La expresión “prevenir cáncer” o “prevención de cáncer” se refiere a retrasar, inhibir o evitar la aparición de un cáncer en un mamífero en el que la aparición de oncogénesis o tumorigénesis no está demostrada pero se identifica una predisposición a cáncer como se determina mediante identificación genética, por ejemplo, o de otro modo. La expresión incluye también tratar un mamífero que tenga afecciones premalignas para detener la progresión o causar la regresión de las afecciones premalignas a malignidad. Los ejemplos de afecciones premalignas incluyen hiperplasia, displasia y metaplasia. En algunas realizaciones, la molécula de unión es un anticuerpo anti-CD134 o un fragmento del mismo como se describe en el presente documento. En otra realización de la invención se proporciona una molécula de unión seleccionada del clon 12H3 y/o clon 20E5 del anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de cualquier anticuerpo. En otra realización, el mamífero es un ser humano.

Una diversidad de cánceres incluyendo malignos o benignos y/o primarios o secundarios se puede tratar o prevenir con un método según la invención. Los ejemplos de tales cánceres son conocidos por los expertos en la materia y están enumerados en libros de texto convencionales tales como el Merck Manual of Diagnosis and Therapy (publicado por Merck).

En otra realización de la invención, las moléculas de unión se pueden administrar solitario como monoterapia o se pueden administrar en combinación con uno o más agentes terapéuticos o terapias adicionales. Por tanto, en otra realización de la invención se proporciona un método de tratamiento o prevención de cáncer mediante una terapia de combinación, método que comprende administrar una molécula de unión como se describe en el presente documento en combinación con una o más terapias o agentes terapéuticos adicionales. La expresión “terapia adicional” se refiere a una terapia que no emplea una molécula de unión proporcionada por la divulgación como un agente terapéutico. La expresión “agente terapéutico adicional” se refiere a cualquier agente terapéutico distinto de una molécula de unión proporcionada por la divulgación. En algunas realizaciones, la molécula de unión es un clon 12H3 y/o clon 20E5 de anticuerpo anti-CD134 humano o un fragmento de unión a antígeno de cualquier anticuerpo. En un aspecto particular, la presente divulgación proporciona una terapia de combinación para tratar cáncer en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión proporcionada por la divulgación en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En una realización adicional el mamífero es un ser humano.

Se puede usar una amplia diversidad de agentes terapéuticos contra el cáncer en combinación con una molécula de unión. Un experto en la materia reconocerá la presencia y el desarrollo de otras terapias contra el cáncer que se pueden usar en combinación con los métodos y las moléculas de unión de la presente divulgación y no se limitará a las formas

de terapia expuestas en el presente documento. Los ejemplos de categorías de agentes terapéuticos adicionales que se pueden usar en la terapia de combinación para tratar el cáncer incluyen (1) agentes quimioterapéuticos, (2) agentes inmunoterapéuticos y (3) agentes de terapia hormonal.

La expresión “agente quimioterapéutico” se refiere a una sustancia química o biológica que puede causar la muerte de células cancerosas o interferir con la división, reparación, crecimiento y/o función de células cancerosas. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen todos los desvelados en los documentos WO 2006/088639, WO 2006/129163 y US 20060153808, cuyas divulgaciones se incorporan por referencia en el presente documento.

La expresión “agente inmunoterapéuticos” se refiere a una sustancia química o biológica que puede aumentar una respuesta inmunitaria de un mamífero. Los ejemplos de agentes inmunoterapéuticos incluyen: bacilo Calmette-Guerin (BCG); citocinas tales como interferones; vacunas tales como inmunoterapia personalizada MyVax, Onyvax-P, Oncophage, GRNVACI, Favld, Provenge, GVAX, Lovaxin C, BiovaxID, GMXX y NeuVax; y anticuerpos tales como alemtuzumab (CAMPATH), bevacizumab (AVASTIN), cetuximab (ERBITUX), gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG), ibritumomab tiuxetan (ZEVALIN), panitumumab (VECTIBIX), rituximab (RITUXAN, MABTHERA), trastuzumab (HERCEPTIN), tositumomab (BEXXAR), tremelimumab, CAT-3888 y anticuerpos agonistas de receptor CD40 que se desvelan en el documento WO2003/040170.

La expresión “agente de terapia hormonal” se refiere a una sustancia química o biológica que inhibe o elimina la producción de una hormona o inhibe o contrarresta el efecto de una hormona sobre el crecimiento y/o supervivencia de células cancerosas. Los ejemplos de tales agentes adecuados para los métodos en el presente documento incluyen los que están desvelados en el documento US20070117809. Los ejemplos de agentes de terapia hormonal particulares incluyen tamoxifen (NOLVADEX), toremifeno (Fareston), fulvestrant (FASLODEX), anastrozol (ARIMIDEX), exemestano (AROMASIN), letrozol (FEMARA), acetato de megestrol (MEGACE), goserelina (ZOLADEX) y leuprolida (LUPRON). Las moléculas de unión de esta divulgación también se pueden usar en combinación con terapias hormonales no farmacológicas tales como (1) métodos quirúrgicos que eliminan todo o parte de los órganos o glándulas que participan en la producción de la hormona, tales como los ovarios, los testículos, la glándula suprarrenal, la glándula pituitaria y (2) tratamiento con radiación en el que los órganos o las glándulas del paciente se someten a radiación en una cantidad suficiente para inhibir o eliminar la producción de la hormona abordada.

En otra realización de la invención se proporciona un método de tratamiento o prevención de cáncer mediante una terapia de combinación, método que comprende administrar una molécula de unión como se desvela en el presente documento, y cirugía para eliminar un tumor. La molécula de unión se puede administrar al mamífero antes, durante o después de dicha cirugía.

La terapia de combinación para tratar cáncer también incluye la combinación de una molécula de unión proporcionada por la divulgación con terapia por radiación, tal como radioterapia ionizante (electromagnética) (por ejemplo, rayos X o rayos gamma) y terapia con radiación de haz de partículas (por ejemplo, radiación con energía lineal alta). La fuente de radiación puede ser externa o interna al mamífero. La molécula de unión se puede administrar al mamífero antes, durante o después de la terapia con radiación.

Las moléculas de unión y composiciones proporcionadas por la presente divulgación se pueden administrar a través de cualquier vía de administración entérica o vía parenteral adecuada. La expresión “vía entérica” de administración se refiere a la administración a través de cualquier parte del tracto gastrointestinal. Los ejemplos de las vías entéricas incluyen la vía oral, a través de la mucosa, bucal y rectal o la vía intragástrica. “Vía parenteral” de administración se refiere a una vía de administración distinta de la vía entérica. La vía y el método de administración adecuados pueden variar dependiendo de varios factores tales como el anticuerpo específico que se está usando, la velocidad de absorción deseada, la formulación o forma de dosificación específica usada, el tipo o gravedad del trastorno que se está tratando, el sitio de acción específico y las afecciones del paciente y se puede seleccionar de forma sencilla por una persona experta en la materia.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” de una molécula de unión se refiere a una cantidad que es eficaz con un fin terapéutico pretendido. Por ejemplo, en el contexto de aumentar una respuesta inmunitaria, una “cantidad terapéuticamente eficaz” es una cantidad que es eficaz en la estimulación, provocación, aumento, mejora o ampliación de cualquier respuesta de un sistema inmunitario de un mamífero. En el contexto de tratar cáncer, una “cantidad terapéuticamente eficaz” es cualquier cantidad que es suficiente para causar cualquier efecto deseable o beneficioso en el mamífero que se está tratando, tal como inhibición o crecimiento adicional o propagación de células cancerosas, muerte de células cancerosas, inhibición de la recurrencia de cáncer, reducción del dolor asociado al cáncer o supervivencia mejorada del mamífero. En un método de prevención de cáncer, una “cantidad terapéuticamente eficaz” es cualquier cantidad que es eficaz en el retraso, inhibición o prevención de la aparición de un cáncer en el mamífero al que se administra la molécula de unión.

La cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión habitualmente varía de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 500 mg/kg y más habitualmente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 100 mg/kg del peso corporal del mamífero. Por ejemplo, la cantidad puede ser aproximadamente 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 50 mg/kg o 100 mg/kg del peso corporal del mamífero. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD134 humano está en el intervalo de aproximadamente 0,1 - 30 mg/kg del peso corporal del mamífero. Se puede determinar de forma sencilla por un experto en la materia el nivel de dosificación preciso a administrar y dependerá de varios factores tales como el tipo y la gravedad del trastorno a tratar, la

molécula de unión particular empleada, la vía de administración, el momento de la administración, la duración del tratamiento, la terapia adicional particular empleada, la edad, el sexo, peso, estado, salud general e historial médico previo del paciente que se está tratando y factores similares bien conocidos en la materia.

Una molécula de unión o composición habitualmente se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada tres meses o anualmente. Un régimen de tratamiento ilustrativo incluye la administración una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a seis meses. Los regímenes de dosificación típicos para un anticuerpo anti-CD134 humano incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa, usando uno de los siguientes programas de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosificaciones, entonces cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

Esta invención se aclara adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no están concebidos de ninguna manera como limitaciones impuestas sobre el alcance de la misma. Por el contrario, se ha de entender claramente que se puede recurrir a diversas otras realizaciones, modificaciones y equivalentes de las mismas que después de leer la descripción en el presente documento pueden sugerirse a los expertos en la materia sin apartarse del alcance de la presente invención y/o el ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1. Generación de anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD134 humano (= OX40)

(a). Generación de células de insecto Sf9 que expresan CD134 en superficie

Se optimizó ADNc que codificaba la proteína CD134 humana (GenBank ref CAB96543.1; véase la SEC ID N° 1) para expresión en células de insecto Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) y se sintetizó por GENEART, Regensburg, Alemania (véase SEC ID N° 2). Este ADNc se subclonó en plásmido de transferencia de baculovirus pVL1393 (kit de transfección BD cat N° 560129; BD Biosciences). Posteriormente, se cotransfectaron células de insecto Sf9 (ATCC) con el plásmido de transferencia pVL1393 que contenía ADNc que codificaba CD134 humano junto con ADN de Baculovirus BaculoGold (kit de transfección de BD) y después se incubó a 27 °C durante 4-5 días. Después de esta etapa de co-transfección, se recogió el sobrenadante y se almacenó a 4 °C, y se usó para infectar más células de insecto Sf9 para amplificación de virus. Para este fin, se transfectaron células de insecto Sf9 con baculovirus recombinante amplificado, y después se incubó a 27 °C durante 3-5 días. Estas células de insecto Sf9 se recogieron, se lavaron con PBS estéril, y se separaron en alícuotas a 5×10^6 células/250 µl en PBS y se almacenaron a -80 °C para obtener lisados celulares. Antes del almacenamiento, se confirmó la expresión en superficie

de CD134 humano en células de insecto Sf9 transfectadas usando anti-CD134 humano de ratón conjugado con ficoeritrina (PE) 1:10 (clon ACT35; BD Biosciences) y citometría de flujo.

(b). Inmunización y generación de anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD134 humano

Se inyectó por vía subcutánea a ratones BALB/c (hembras, 6 semanas de edad; Charles River Laboratories) aproximadamente 400 µl de lisados de células de insecto Sf9 transfectadas con CD134 humano (alícuota de lisado celular de 250 µl + 250 µl de adyuvante completo de Freund; Sigma) el día 0. Se proporcionaron inyecciones subcutáneas similares usando lisados de células de insecto Sf9 transfectadas con CD134 y adyuvante incompleto de Freund (Sigma) el día 21 y día 42. Se proporcionaron inyecciones de refuerzo intraperitoneales con lisados de células de insecto Sf9 transfectadas con CD134 humano (250 µl/ratón) sin adyuvante el día 61 y el día 62. El día 65, se fusionaron esplenocitos de ratones inmunizados con células de mieloma SP2/ 0 (ATCC) usando tecnología de hibridoma convencional descrito inicialmente por Köhler y Milstein (Nature 1975; 256: p495-497). Se expandieron hibridomas, que producían anticuerpos (clase de IgG de ratón) frente a CD134 humano (explorado con ELISA convencional y técnicas de citometría de flujo usando una proteína de fusión Fcγ humano: CD134 humano recombinante (R&D Systems) y blastos de células T CD4 estimuladas con PHA (Roche) que expresaban CD134 humano (véase Ejemplo 2 posterior) como dianas, respectivamente), se criopreservaron y se clonaron por dilución limitante. Se purificaron anticuerpos monoclonales específicos anti-CD134 humano usando columnas de proteína G (GE Healthcare), y dieron como resultado el clon 12H3 (isotipo IgG1 κ de ratón; determinado con el kit de isotipo de anticuerpo monoclonal de ratón de Roche Isostrip™) y el clon 20E5 (isotipo IgG1κ de ratón; misma referencia) de anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD134 humano.

Ejemplo 2. Caracterización por citometría de flujo de los anticuerpos monoclonales de ratón anti CD34 humano clones 12H3 y 20E5

(a). Expresión de CD134 en linfocitos T humanos estimulados con PHA

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de donantes sanos (consentimiento informado) por centrifugación de densidad en Lymphoprep (1,077 g/ml; Nycomed). Posteriormente, se complementaron $1-2 \times 10^6$ PBMC/ml en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco) que contenía suero de ternero fetal al 10 % (Bodinco) y gentamicina 50 µg/ml (Gibco) con 0, 0,1, 1,0 o 10,0 µg/ml de fitohemaglutinina-M (PHA - M; Roche) a 37 °C/CO₂ 5 % durante 1-3 días. Después del cultivo, las PBMC se recogieron y se pusieron a $1 - 2 \times 10^6$ células/ml en solución salina tamponada con fosfato helada que contenía albúmina de suero bovino 0,1 % (Sigma)/ NaN₃ 0,05 % (PBS/BSA/NaN₃) complementado con suero agrupado humano 10 % (HPS; receptores Fcγ de bloqueo; BioWhittaker). Las células se incubaron con 10 µg/ml del anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon ACT35 disponible en el mercado (isotipo IgG1 de ratón; BD Biosciences, Alphen aan de Rijn, Países Bajos) durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado

exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se incubaron posteriormente con anticuerpos de cabra anti IgG de ratón conjugados con PE diluido 1:200 (Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se incubaron con anticuerpo de ratón anti CD3 humano conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluido 1:20 (BD Biosciences) para detectar linfocitos T durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se fijaron en formaldehído al 2 % en PBS/BSA/NaN₃ durante 30 minutos a 4 °C. La unión de los anticuerpos se midió usando citometría de flujo (FACSCalibur; BD Biosciences).

Como se muestra en la Figura 1 (n = 1 de cada donante), los linfocitos T humanos en reposo/no estimulados derivados de sangre periférica no expresaron ningún CD134, sin embargo, PHA estimuló de forma dependiente de la dosis los linfocitos T CD3^{positivo} humanos para expresar CD134 en superficie. Cuando se expusieron a PHA 10 µg/ml, los niveles de expresión de CD134 en linfocitos T CD3^{positivo} humanos activados parecían alcanzar una meseta entre el “día 1” y el “día 2”, sin embargo, el porcentaje de linfocitos T CD134^{positivo}/CD3^{positivo} humanos aumentó en función del tiempo durante la experimentación.

(b). Expresión de CD134 en la subpoblación de linfocitos T CD4 humanos estimulados con PHA

Se generaron linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA (a 0 y 100 µg/ml durante 1 día, véase anteriormente). Las células se recogieron y se pusieron a 1-2x10⁶/ml en PBS/BSA/NaN₃ helado complementado con HPS 10 % (receptores Fcγ de bloqueo; BioWhittaker). Las células se incubaron con anticuerpo de ratón anti CD4 humano conjugado con FITC diluido 1:10 (BD Biosciences) o anticuerpo de ratón anti-CD8 humano conjugado con FITC diluido 1:10 (BD Biosciences) en combinación con el clon ACT35 de ratón anti-CD134 humano conjugado con PE disponible en el mercado diluido 1:10 (BD Biosciences) durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se fijaron en formaldehído al 2% en PBS/BSA/NaN₃ durante 30 minutos a 4 °C. La unión de los anticuerpos se midió usando citometría de flujo (FACSCalibur; BD Biosciences).

Como se muestra en la Figura 2, se observó expresión de CD134 en linfocitos T CD4^{positivo} humanos estimulados con PHA y no en linfocitos T CD4^{positivo} humanos en reposo. Se descubrió baja expresión de CD134 en linfocitos T CD8^{positivo} humanos activados por PHA y no en linfocitos T CD8^{positivo} humanos en reposo (datos no mostrados).

(c). Unión de anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5 en linfocitos T que expresan CD134 humano estimulados con PHA

Se generaron linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA (a 10 µg/ml durante 2 días; véase anteriormente). Las células se recogieron y se pusieron a 1 - 2x10⁶/ml en PBS/BSA/NaN₃ helado complementado con HPS 10 % (receptores Fcγ de bloqueo; BioWhittaker). Las células se incubaron con 0, 0,007, 0,02, 0,07, 0,2, 0,6, 1,9, 5,6,

16,7, 50,0 µg/ml del anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon ACT35 disponible en el mercado (isotipo IgG de ratón; BD Biosciences) y anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 o clon 20E5 generado de forma interna durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se incubaron posteriormente con anticuerpos de cabra anti IgG de ratón conjugados con PE diluido 1:200 (Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se incubaron con anticuerpo de ratón anti-CD3 humano conjugado con FITC diluido 1:20 (BD Biosciences) para detectar linfocitos T durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se fijaron en formaldehído al 2 % en PBS/BSA/NaN₃ durante 30 minutos a 4 °C. La unión de anticuerpos se midió usando citometría de flujo (FACSCalibur; BD Biosciences).

Como se muestra en la Figura 3 (media ± DT; resultados observados en dos donantes), el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon ACT35, clon 12H3 y clon 20H5 saturó las moléculas de superficie de CD134 humano en linfocitos T CD3^{positivo} estimulados con PHA a aproximadamente 5,0-10,0 µg/ml. Usando estos dos donantes, se observó unión semi máxima a aproximadamente 0,5 µg/ml para el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3, y a aproximadamente 2,5 µg/ml para el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon ACT35 y clon 20E5.

(d). Unión de los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5 en linfocitos T positivos para CD8 y positivos para CD4 que expresaban CD134 humano estimulados con PHA

Se generaron linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA (a 20 µg/ml durante 1 día, véase anteriormente). Las células se recogieron y se pusieron a $1-2 \times 10^6$ /ml en PBS/BSA/NaN₃ helado complementado con HPS 10 % (receptores Fcγ de bloqueo; BioWhittaker). Las células se incubaron con 20,0 µg/ml de control de isotipo IgG1κ de ratón (BD Biosciences) o con 20,0 µg/ml del anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 o clon 20E5 durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se incubaron posteriormente con anticuerpos de cabra anti IgG de ratón conjugados con PE diluido 1:100 (Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con anticuerpo de ratón anti-CD4 humano conjugado con FITC diluido 1:20 (BD Biosciences) o con anticuerpo de ratón anti CD8 humano conjugado con FITC diluido 1:20 (BD Biosciences) para detectar subpoblaciones de linfocitos T. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se fijaron en formaldehído al 2 % en PBS/BSA/NaN₃ durante 30 minutos a 4 °C. La unión de los anticuerpos se midió usando citometría de flujo (FACSCalibur; BD Biosciences).

Como se muestra en la Figura 4, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 y clon 20E5 demostró tinción positiva en la subpoblación de linfocitos T CD4^{positivo} humanos activados y baja tinción positiva en la subpoblación de linfocitos T CD8^{positivo} humanos activados.

(e). *Competición cruzada de anticuerpos de ratón anti-CD134 humanos clones 12H3 y 20E5 no marcados con anticuerpos de ratón anti-CD134 comerciales conjugados con PE en linfocitos T que expresan CD134 humanos estimulados con PHA*

Se generaron linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA (a 10 µg/ml o a 20 µg/ml durante 4 días o durante 1 día, respectivamente; véase anteriormente). Las células se recogieron y se pusieron a $1-2 \times 10^6$ células/ml en PBS/BSA/ NaN_3 helado complementado con HPS 10 % (receptores $\text{Fc}\gamma$ de bloqueo; BioWhittaker). Las células se incubaron con 20 µg/ml de anticuerpo de ratón anti-CD134 humanos clon 12H3 no marcado 10 µg/ml o con el clon 20E5 no marcado 10 µg/ml durante 30 minutos a 4 °C. Las células se incubaron posteriormente con el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon ACT35 (BD Biosciences) o clon L106 (BD Biosciences; véase también patente de Godfrey) disponible en el mercado conjugado con PE diluido 1:20 durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/ NaN_3 , las células se fijaron en formaldehído al 2 % en PBS/BSA/ NaN_3 durante 30 minutos a 4 °C. La unión de anticuerpos anti-CD134 disponibles en el mercado conjugados con PE se midió usando citometría de flujo (FACSCalibur; BD Biosciences).

Como se muestra en la Figura 5, la pre-incubación con el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 no marcado bloqueó parcialmente la unión del anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon L106 conjugado con PE comercial frente a CD134 humano en linfocitos T estimulados con PHA. La pre-incubación con el clon de anticuerpo de ratón anti-CD134 humano no marcado 20E5 bloqueó ligeramente la unión del anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon L106 conjugado con PE comercial frente a CD134 humano en linfocitos T estimulados con PHA. La pre-incubación con el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 y clon 20E5 no marcado no mostró efectos en la unión del anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon ACT35 conjugado con PE comercial frente a CD134 humano en linfocitos T estimulados con PHA.

Estos resultados demostraron que el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 reconoció específicamente CD134 humano (bloqueo parcial de la unión del clon L106) en linfocitos T estimulados con PHA, y se unió (ii) con un epítipo no idéntico en CD134 humano, que se reconocía por el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon L106 comercial. Estos resultados también demostraron que el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 (i) reconocía específicamente CD134 humano (bloqueo ligero de la unión del clon L106) en linfocitos T estimulados con PHA, y (ii) se unía con un epítipo no idéntico, que se reconocía por el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon L106 comercial. Además, estos resultados demostraron que el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 y clon 20E5 parecían reconocer los epítipos CD134 humanos en linfocitos T estimulados con PHA, que eran diferentes del epítipo reconocido por el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon ACT35 comercial. Además, estos resultados demostraron que el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 y clon 20E5 parecía reconocer epítipos CD134 humanos diferentes (lo que se demuestra por bloqueo parcial

frente a bloqueo ligero de la unión de L106, respectivamente) en linfocitos T estimulados con PHA.

(f). Unión simultánea de ligando OX40 humano recombinante y los anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5 en linfocitos T que expresan CD134 humano estimulados con PHA

Se generaron linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA (a 10 µg/ml durante 1 día, véase anteriormente). Las células se recogieron y se pusieron a 2×10^6 células/ml en PBS/BSA/NaN₃ helado complementado con HPS 10 % (receptores Fcγ de bloqueo; BioWhittaker). Las células se incubaron con 10,0 µg/ml de ligando OX40 humano recombinante marcado con polihistidina (OX40L; R & D Systems) en combinación con 50,0 µg/ml de anticuerpo anti-polihistidina (IgG1 de ratón, clon AD1.1.10; R & D Systems) durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se incubaron posteriormente con anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con FITC diluido 1:100 (Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se incubaron con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 o clon 20E5 biotinilado (usando N-hidroxisuccinimido- biotina de Pierce) 10,0 µg/ml durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se incubaron con estreptavidina conjugada con PE diluido 1:100 (Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se fijaron en formaldehído al 2 % en PBS/BSA/NaN₃ durante 30 minutos a 4 °C. La unión de OX40L humano y anticuerpos anti-CD134 humano se midió usando citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences).

Como se muestra en la Figura 6, tanto el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 como el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 se unieron simultáneamente con OX40L humano en linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA. Esto indicó que el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 y clon 20E5 no interaccionan con epítomos dentro de la región de unión de OX40L en receptores de CD134 humanos. Este hallazgo se diferencia del anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon L106 disponible en el mercado (Universidad de Stanford/Patente de Godfrey EP 0 726 952 B1), que reconocía un epítomo dentro de la región de unión de OX40L humana de receptores de CD134 humanos (Taylor y Schwarz. J Immunol Methods 2001, 255: 67-72; Kirin y La Jolla Institute/patente de Croft WO 2007/ 062235 A2).

(g). Expresión de CD134 en linfocitos T efectores y reguladores humanos después de estimulación con perlas estimuladoras de anticuerpo anti-CD3 humano/anti-CD28 humano

Se purificaron linfocitos T CD4 humanos de PBMC por selección positiva usando anticuerpos de ratón anti-CD4 humano conjugados con microperlas (Miltenyi Biotec) y columnas Magnet/LS VarioMACS™ (Miltenyi Biotec). Posteriormente, estos linfocitos T CD4 se tiñeron con anticuerpos de ratón anti-CD4 humano conjugados con FITC (DAKO)

y anticuerpos de ratón anti-CD25 humano conjugados con PE (BD Biosciences). Se seleccionaron linfocitos T efectores convencionales CD4^{positivo}/CD25^{negativo} (Tefs) y linfocitos T reguladores CD4^{positivo}/CD25^{alto} (Tregs) usando un clasificador celular por citometría de flujo Altra (Beckman-Coulter). Esto dio como resultado enriquecimientos de > 95 % de Tefs y de > 95 % de Tregs. Los Tefs y Tregs se pusieron en $2,5 \times 10^5$ células/ml en medio de cultivo RPMI-1640/glutamax (Gibco) complementado con piruvato 0,02 mM (Gibco) penicilina 100 U/ml (Gibco), estreptomicina 100 µg/ml (Gibco) y HPS inactivado por calor 10 % (HPS_i; de LMI). Después, las células se sembraron a $2,5 \times 10^4$ células/200 µl/pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Greiner), y se estimularon con perlas estimuladoras de anticuerpo de ratón anti CD3 humano/de ratón anti-CD28 humano (perlas CD3/CD28; Invitrogen) a 1 perla/2 células en presencia de interleucina-2 humana recombinante 25 U/ml (Proleukin® de Novartis Pharmaceuticals UK Ltd) a 37 °C/CO₂ 5 % durante 2-8 días. Después del cultivo, las células se recogieron y se pusieron a $1-2 \times 10^6$ células/ml en PBS helado/BSA 0,2 % y se tiñeron simultáneamente con anticuerpo de ratón anti-CD4 humano conjugado con FITC diluido 1:50 (Dako), anticuerpo de ratón anti-CD25 humano conjugado con PE diluido 1:10 (BD Biosciences), anticuerpo de ratón anti-CD3 humano conjugado con ECD™ diluido 1:50 (Beckman-Coulter), anticuerpo de ratón anti-CD134 humano conjugado con PE-Cy™ 5 diluido 1:10 (clon ATC35; BD Biosciences) y anticuerpo de ratón anti-CD127 humano conjugado con PE-Cy™ 7 diluido 1:10 (eBiosciences). La unión de anticuerpos se midió usando citometría de flujo (FACSCalibur; BD Biosciences).

Como se muestra en la Figura 7 (n = 1 de cada donante), los Tefs humanas y Tregs humanas en reposo/no estimulados purificados de sangre periférica (día 0) no expresaban ningún CD134, sin embargo, los Tefs humanas y Tregs humanas estimulados con perlas CD3/CD28 expresaron CD134 en superficie. La expresión de CD134 en Tefs humanas y Tregs humanas activados alcanzó un pico después de 2 días en cultivo, y se atenuó después de 5 y 8 días en cultivo.

Ejemplo 3. Caracterización biológica de los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5

(a). Proliferación de linfocitos T que expresan CD134 humano estimulados con PHA después de tratamiento con los anticuerpos de ratón anti- CD134 humano clones 12H3 y 20E5

Se generaron linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA (a 0 y 10 µg/ml durante 1 día, véase anteriormente). Las células se recogieron y se suspendieron a 2×10^6 células/ml en medio de cultivo RPMI (Gibco) que contenía suero de ternero fetal al 10 % (Bodinco) y gentamicina 50 µg/ml (Gibco). Las células se sembraron a $0,1 \times 10^6$ células/100 µl/pocillo (es decir, 1×10^6 células/ml) en placas de fondo plano de 96 pocillos (Corning) y se expusieron a 0, 0,025, 0,25, 2,5 o 25,0 µg/ml del anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 o el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 y/o en combinación con 0, 0,01, 0,1 o 1,0 µg/ml de OX40L

humano recombinante marcado con polihistidina (en presencia de una relación molar 1:5 de anticuerpos anti-polihistidina de ratón; R & D Systems) a 37 °C/CO₂ 5 % durante 6 días. Después de 6 días, se midió la proliferación celular usando el ELISA™ de proliferación celular colorimétrico (incorporación de BrdU) (Roche) y un lector de ELISA (BioRad) a A450 nm.

Como se muestra en la Figura 8 (media $\pm$ DT, n = 4 usando un donante), el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 indujeron de forma dependiente de la dosis proliferación en linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA. El anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 indujo proliferación a 0,25, 2,5 y 25 μ g/ml. El anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 indujo proliferación a 2,5 y 25 μ g/ml. Además, OX40L humano también indujo de forma dependiente de la dosis proliferación en linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA. OX40L humano indujo proliferación a 0,1 y 1,0 μ g/ml. Los linfocitos T CD134^{negativo} humanos en reposo (sin estimulación por PHA) no mostraron ninguna respuesta proliferativa después de tratamiento con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 u OX40L humano (datos no mostrados).

Como se muestra en la Figura 9 (media $\pm$ DT, n = 2 usando un donante), el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 (a 2,5 y 25 μ g/ml), el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 (a 2,5 y 25 μ g/ml), y OX40L humano (a 1,0 μ g/ml) indujeron proliferación en linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA. Los no tratados (solamente medio) o el tratamiento con control de isotipo IgG1 κ de ratón (a 2,5 y 25 μ g/ml; BD Biosciences) no demostraron ningún efecto en proliferación de linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA. La combinación de anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 a 2,5 y 25 μ g/ml (o a concentraciones menores; datos no mostrados) o el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 a 2,5 y 25 μ g/ml (o a concentraciones menores; datos no mostrados) con OX40L humano a 1,0 μ g/ml (o a concentraciones menores; datos no mostrados) no demostró ningún efecto recíproco (es decir, sinérgico o aditivo, o incluso inhibidor) en la proliferación de linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA.

(b). Proliferación de linfocitos T efectores y T reguladores que expresaban CD134 humano estimulados con perlas anti-CD3 humano/anti-CD28 después de tratamiento con los anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5

Se purificaron linfocitos T CD4 humanos de PBMC por selección negativa usando un cóctel de anticuerpos de ratón (BD Biosciences) dirigidos contra CD8 (clon RPA-T8), CD14 (clon M5E2), CD16 (clon 3G8), CD19 (clon 4G7), CD33 (clon P67.6), CD56 (clon B159) y CD235a (HIR2) humanos. Después de una incubación con IgG de oveja anti-ratón conjugado con Dynabeads® (Invitrogen), se recogieron linfocitos T CD4 no unidos del

concentrador de partículas magnéticas Dynal, MPC™ -6 (Invitrogen). A partir de estos linfocitos T CD4 enriquecidos se separaron Tregs CD25^{alto} y Tefs CD25^{negativo} por clasificación de MACS usando 10 µl de anticuerpos de ratón anti-CD25 humano conjugados con microperlas (Miltenyi Biotec)/10⁷ células y columnas de MS/Magnet MiniMACS™ (columnas LS/Magnet VarioMACS™ Miltenyi Biotec (Miltenyi bistec)). Esto dio como resultado enriquecimientos de > 90 % de Tefs y de > 90 % de Tregs. Los Tefs y Tregs se pudieron en 0,25x10⁶ células/ml en medio de cultivo RPMI-1640/glutamax (Gibco) complementado con piruvato 0,02 mM (Gibco), penicilina 100 U/ml (Gibco), estreptomicina 100 µg/ml (Gibco) y HPS_i 10 %. Después, se sembraron Tefs y Tregs a 2,5x10⁴ células/200 µl/pocillo (es decir, 0,125x10⁶ células/ml) en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Greiner) y se estimularon con perlas CD3/CD28 (Invitrogen) a 1 perla/5 células con o sin el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 5,0 µg/ml, anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 5,0 µg/ml, OX40L humano recombinante marcado con polihistidina 1,0 µg/ml (en presencia de una relación molar 1:5 de anticuerpo anti- polihistidina de ratón; R & D Systems), una combinación de 5,0 µg/ml de anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 con OX40L humano recombinante marcado con polihistidina 1,0 µg/ml (en presencia de una relación molar 1:5 de anticuerpo anti-polihistidina de ratón), o una combinación de anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 5,0 µg/ml con OX40L humano recombinante marcado con polihistidina 1,0 µg/ml (en presencia de una relación molar 1:5 de anticuerpo anti-polihistidina de ratón) a 37 °C/CO₂ 5 % durante 4 o 5 días. Después de 4 o 5 días, se midió la proliferación celular usando incorporación de 0,5 µCi de timidina tritiada (Perkin y Elmer) y un contador β (Canberra Packard).

Como se muestra en la Figura 10 (media ± DT), aunque las perlas estimuladoras CD3/CD28 por sí solas indujeron proliferación considerable en Tefs que expresaban CD134 humanos (es decir, medio), el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 u OX40L humano indujeron proliferación adicional en Tefs que expresaban CD134 humano estimulados con perlas CD3/CD28. El anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 no indujo proliferación adicional en Tefs que expresaban CD134 humano estimulados con perlas CD3/CD28.

Como se muestra en la Figura 11 (media ± ETM de 5 donantes), el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 no indujeron o indujeron proliferación baja de Tregs que expresaban CD134 humano estimulados con perlas CD3/CD28, mientras que OX40L humano indujo proliferación muy fuerte en Tregs que expresaban CD134 humano estimulados con perlas CD3/CD28.

Como se muestra en la Figura 12A (media ± DT), el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 en combinación con OX40L humano no demostró ningún efecto recíproco (es decir, inhibidor, sinérgico o aditivo) en Tefs que expresaban CD134 humano estimulados con perlas CD3/CD28. Además, el anticuerpo monoclonal de ratón

anti-CD134 humano clon 20E5 en combinación con OX40L humano no demostró ningún efecto recíproco (es decir, inhibidor, sinérgico o aditivo) en Tefs que expresaban CD134 humano estimulados con perlas CD3/CD28 (datos no mostrados).

Como se muestra en la Figura 12B (media $\pm$ DT), a diferencia del efecto (falta de él) observado con respuestas proliferativas mediadas por OX40L humano en Tefs que expresaban CD134 humano estimulados con perlas CD3/CD28, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 suprimía fuertemente las respuestas proliferativas mediadas por OX40L humano en Tregs que expresaban CD134 humano estimulados con perlas CD3/CD28.

(c). Función de supresión de linfocitos T reguladores que expresaban CD134 humano estimulados con perlas anti-CD3 humano/anti-CD28 después del tratamiento con anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5

Se purificaron linfocitos T CD4 humanos a partir de PBMC, y se enriquecieron Tefs y Tregs como se ha descrito en el Ejemplo 3 (b) anterior. Los Tefs y Tregs se pusieron en 0,25x10⁶ células/ml en medio de cultivo RPMI 1640/glutamax (Gibco) complementado con piruvato 0,02 mM (Gibco), penicilina 100 U/ml (Gibco), estreptomicina 100 µg/ml (Gibco), HPS_i 10 %. Después, los Tefs se sembraron a 2,5x10⁴ células/200 µl/pocillo (es decir, 0,125x10⁶ Tefs/ml) y se co-cultivaron con 2,5x10⁴ Tregs supresores/200 µl/pocillo (es decir, 0,125x10⁶ Tregs/ml; relación Tefs/ Tregs = 1:1) en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Greiner). Estos co-cultivos de Tefs/Tregs se estimularon con perlas CD3/CD28 (Invitrogen) a 1 perla/10 células con o sin anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 5,0 µg/ml, anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 20E5, 5,0 µg/ml y OX40L humano recombinante marcado con polihistidina 1,0 µg/ml (en presencia de una relación molar 1:5 de anticuerpo anti-polihistidina de ratón; R & D Systems) a 37 °C/CO₂ 5 % durante 5 días. Después de 5 días, la proliferación celular se midió usando incorporación de timidina tritiada 0,5 µCi (Perkin y Elmer) y un contador β (Canberra Packard).

Como se muestra en la Figura 13 (media $\pm$ DT), las Tregs humanas suprimieron respuestas proliferativas de Tefs humanas inducidas por perlas CD3/CD28 (es decir, medio). Esta función supresora de Tregs humanas se amortiguó en presencia del anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 o en presencia de OX40L humano. El clon del anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano 20E5 no mostró ningún efecto en la función supresora de Tregs humanas.

Ejemplo 4. Caracterización genética molecular de los clones de anticuerpos monoclonales de ratón anti- CD134 humano 20E5 y 12H3

(a). Isotipación y degradación de Edman

Se determinaron la clase, isotipo y tipo de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón de los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD134 humano clones 20E5 y 12H3 purificados con proteína G usando el kit de isotipo de anticuerpo monoclonal de ratón IsoStrip™ (Roche), y se mostró que ambos anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD134

humano clones 20E5 y 12H3 eran IgG1 de ratón con cadenas ligeras κ.

Después de electroforesis LDS-PAGE convencional, usando el sistema Novex® NuPage® de gel premoldeado (Invitrogen) en condiciones reducidas (DTT y calentamiento a 70 °C), se electrotransfirió el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 a una membrana de transferencia de fluoruro de polivinilideno (PDVF/Immobilon-P) (Millipore), y se tiñó con azul brillante de Coomassie (BioRad). Después, las bandas de cadenas pesadas y ligeras (50 kDa y 25 kDa, respectivamente) se escindieron de la membrana de PVDF, y se usaron para análisis de degradación de Edman (realizado por EuroSequence, Groningen, Países Bajos) para determinar las secuencias de aminoácidos N terminales. Los resultados se muestran en la SEC ID N° 3 y SEC ID N° 61 para el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 20E5. Se determinaron once aminoácidos de los extremos N terminal de cadenas pesadas y 11 aminoácidos de los extremos N-terminal de cadenas ligeras.

(b). RT PCR

Se recogieron células de hibridoma del clon 20E5 y 12H3 de cultivo celular. Las células se lavaron con PBS, se separaron en alícuotas en frascos que contenían 5 x 10⁶ células, y se almacenaron como sedimentos a -80 °C. Los sedimentos celulares se usaron para aislar ARN usando el mini kit de aislamiento RNeasy (Qiagen). Se determinó la concentración de ARN (A260 nm) y el ARN se almacenó a -80 °C. Rendimiento total de ARN aislado: 27,3 µg y 58,4 µg para el clon 20E5 y clon 12H3, respectivamente (relación A260/A280 para ambos 1,9). Por transcriptasa inversa, se sintetizó ADNc a partir de 1 µg de ARN usando el kit de síntesis de ADNc de primera cadena menos RevertAid™ H (Fermentas), y se almacenó a -20 °C.

Basándose en el isotipo (kappa/IgG1 de ratón) y análisis de degradación de Edman del anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 20E5, se diseñaron los siguientes cebadores para amplificar regiones V del anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 20E5.

N° de cebador*	Secuencia **	SEC ID N°.	Dirección	Gen
201	GACAGTTGGTGCAGCATCAG	39	antisentido	mkappa
266	CACTGGATGGTGGGAAGATG	40	antisentido	mkappa
203	GGCCAGTGGATAGACAGATG	41	antisentido	mIgG1
204	TGGACAGGGATCCAGAGTTC	42	antisentido	mIgG1
259	GCGAAGTACAAYTNCARCARWSNNGG	43	sentido	20E5HC
260	GCGTACAATTACARCARWSNGGNCC	44	sentido	20E5HC
265	GCGATATACARATGACNCARAC	45	sentido	20E5LC

* N° de acuerdo con el sistema de codificación interna de Bioceros;

** Cebadores degenerados: N = A, C, G o T, Y = C o T, R = A o G, W = A o T, y S = G o C.

Basándose en el isotipo (kappa/IgG1 de ratón) del anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 y los cebadores con sentido que hibridan con ADNc que codifican péptidos señal de ratón (parcialmente basados en Antibody Engineering Volumen 1 Kontermann, Roland E.; Dübel, Stefan (Eds.), Springer Lab Manuals, 2ª ed., 2010), se diseñaron los siguientes cebadores para amplificar regiones V del anticuerpo monoclonal

de ratón anti-CD134 humano clon 12H3.

<i>Nº de cebador*</i>	<i>Secuencia **</i>	<i>SEC ID Nº</i>	<i>Dirección</i>	<i>Gen</i>
416	CAGTGGATAGACAGATGGGGG	46	antisentido	mIgG1
394	ACTGGATGGTGGGAAGATGG	47	antisentido	mkappa
405	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT	48	sentido	Péptido señal
410	ATGGRATGGAGCKGGGTCTTTMTCTT	49	sentido	Péptido señal
389	ATGGGCWTCAAAGATGGAGTCACA	50	sentido	Péptido señal

* Nº de acuerdo con el sistema de codificación interna de Bioceros;
** Cebadores degenerados: N = A, C, G o T, Y = C o T, R = A o G, W = A o T, y S = G o C, M = C o A y K = G o T.

5 Los cebadores 201 y 266 son antisentido diseñados para hibridar dentro de la región constante del gen kappa de ratón en la posición 214-232 y 236-255, respectivamente (basándose en el número de referencia V00807 [versión V00807.1]).

10 Los cebadores 203 y 204 son antisentido diseñados para hibridar dentro de la región constante de IgG1 de ratón en la posición 115-134 y 221-240, respectivamente (basándose en el número de referencia J00453 [versión J00453.1]).

Los cebadores 259 y 260 son cebadores degradados con sentido (degradación respectivamente 512 y 256) que hibridan en el extremo N -terminal (aminoácido 1-8 y 2-9, respectivamente) de la cadena pesada del anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 basándose en la degradación de Edman.

15 El cebador 265 es un cebador degradado con sentido (degradación de 16) que hibrida en el extremo N-terminal (aminoácido 1-7) de la cadena ligera del anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 basándose en la degradación de Edman.

20 Cebador 416 es antisentido diseñado para hibridar dentro de la región constante de IgG1 de ratón en la posición 111-131 (basándose en el número de referencia J00453 [versión J00453.1]).

El cebador 394 es antisentido diseñado para hibridar dentro de la región constante del gen kappa de ratón en la posición 235 a 254 (basándose en el número de referencia V00807 [versión V00807.1]).

25 Los cebadores 389, 405 y 410 son cebadores degradados (degradación respectivamente 2, 8 y 8) que hibridan con secuencias peptídicas señal de anticuerpos murinos. El cebador 389 se diseñó para la cadena ligera, los cebadores 405 y 410 para la cadena pesada.

30 Los cebadores 201, 266, 203, 204, 259, 260 y 265 se usaron en diversas combinaciones para amplificar regiones variables del anticuerpo de ratón anti- CD134 humano clon 20E5, y los cebadores 416, 394, 405, 410 y 389 se usaron en diversas combinaciones para amplificar regiones variables del anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3. Se realizaron diversas PCR diferentes usando ADNc generado de ambos clones como un molde.

35 Se usó ADN polimerasa *Pfx Accuprime*TM (Invitrogen) para amplificar regiones variables de cadenas pesadas y ligeras tanto del anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 como del clon 12H3. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa

al 1 %. Los productos de reacciones de PCR se purificaron en gel y se clonaron en el vector pCR-Blunt II - TOPO® para análisis de secuencia. A partir de plásmidos que contenían un inserto de PCR, se analizaron insertos clonados por secuenciación de ADN (realizada por ServicXS BV, Leiden, Países Bajos o Macrogen, Ámsterdam, Países Bajos) usando T7 para obtener la secuencia consenso para regiones V de los anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clones 20E5 y 12H3. Se obtuvieron once reacciones de cadena pesada de secuencias informativas y tres reacciones de secuencia de cadena ligera informativas para el anticuerpo de ratón anti-CD134 clon 20E5. Se obtuvieron cinco reacciones de cadena pesada de secuencias informativas y 3 reacciones de secuencias de cadena ligera informativas para el anticuerpo de ratón anti-CD134 clon 12H3. Basándose en esta información, se determinaron secuencias consenso de regiones V de ambos anticuerpos (véase SEC ID N° 4, 5, 12 y 13).

El listado o análisis de un documento aparentemente previamente publicado en la presente memoria descriptiva no debería interpretarse como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o es conocimiento general común.

Ejemplo 5. Generación de anticuerpos monoclonales quiméricos IgG4/kappa humano y/o IgG1/kappa humano (es decir, intercambiando dominios constantes de ratón por dominios constantes IgG/kappa humanos) anti-CD134 humano clones 20E5 y 12H3

Basándose en determinadas regiones V murinas (véase Ejemplo 4 (b) anterior) de los anticuerpos de ratón anti-CD134 clones 20E5 y 12H3, se realizó un diseño para generar versiones de anticuerpos quiméricos humanos. Para este fin, se pidieron secuencias de ADNc optimizadas para células CHO (véase SEC ID N° 20 (que codifica la cadena pesada de IgG4 humana quimérica clon 20E5) SEC ID N° 21 (que codifica la cadena κ ligera humana quimérica clon 20E5), SEC ID N° 22 (que codifica la cadena IgG1 pesada humana quimérica clon 20E5), SEC ID N° 23 (que codifica la cadena IgG4 pesada humana quimérica clon 12H3) y SEC ID N° 24 (que codifica la cadena ligera κ humana quimérica clon 12H3)), en GENEART (Regensburg Alemania), que codificaban un péptido señal murino seguido de la cadena ligera variable unida a región constante kappa humana, o seguido de la cadena pesada variable unida con la región constante de IgG humana. Este diseño se realizó para ambos anticuerpos; para el clon 20E5, se unió la cadena pesada variable con IgG4 humana o con la región constante de IgG1 humana; para el clon 12H3, se unió la región de cadena pesada variable con región constante de IgG4 humana. Usando enzimas de restricción adecuadas, se subclonaron ADNc generados en plásmidos de expresión derivados de pcDNA3.1. Se expresaron anticuerpos quiméricos usando el sistema de expresión MAX CHO (células CHO-S) FreeStyle™ (Invitrogen). Se purificaron anticuerpos expresados usando columnas de proteína A de cromatografía de afinidad (GE Healthcare). Para secuencias de aminoácidos quiméricos, véase SEC ID N° 25, 26, 27, 28 y 29.

Ejemplo 6. Caracterización de unión del anticuerpo monoclonal quimérico humano IgG4/kappa y/o IgG1/kappa anti-CD134 humano clon 20E5

(a). *Características de unión del anticuerpo monoclonal humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 en linfocitos T positivos para CD4 que expresan CD134 humano estimulados con PHA*

Se generaron linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA (a 10 µg/ml durante 1 día; véase anteriormente). Las células se recogieron y se pusieron a $1-2 \times 10^6$ células/ml en PBS/BSA/NaN₃ helado. Las células se incubaron con 0, 0,007, 0,02, 0,07, 0,2, 0,6, 1,9, 5,6, 16,7, 50,0 µg/ml de anticuerpo quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se incubaron posteriormente con anticuerpos de ratón anti-IgG4 humano conjugados con FITC diluidos 1:50 (Sigma) durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se incubaron con anticuerpo de ratón anti-CD4 humano conjugado con PE diluido 1:10 (BD Biosciences) durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se fijaron en formaldehído al 2 % en PBS/BSA/NaN₃ durante 30 minutos a 4 °C. La unión de los anticuerpos se midió usando citometría de flujo (FACSCalibur; BD Biosciences).

El anticuerpo quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 saturó las moléculas de superficie CD134 humanas en linfocitos T CD4^{positivo} estimulados con PHA a aproximadamente 5,0-10,0 µg/ml (datos no mostrados). Se observó unión semi-máxima a aproximadamente 1,0 µg/ml para el anticuerpo quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 (datos no mostrados).

(b). *Unión del anticuerpo monoclonal quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 en linfocitos T positivos para CD8 y positivos para CD4 que expresan CD134 humano estimulados con PHA*

Se generaron linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA (a 10 µg/ml durante 1 día; véase anteriormente). Las células se recogieron y se pusieron a $1-2 \times 10^6$ células/ml en PBS/BSA/NaN₃ helado. Las células se incubaron con o sin 20,0 µg/ml del anticuerpo quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se incubaron posteriormente durante 30 minutos a 4 °C con anticuerpos de cabra anti-IgG humano (específicos de Fcγ) conjugados con PE diluido 1:200 (Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se incubaron con anticuerpo de ratón anti-CD4 humano conjugado con FITC diluido 1:10 (BD Biosciences) o con anticuerpo de ratón anti-CD8 humano conjugado con FITC diluido 1:10 (BD Biosciences) para detectar subpoblaciones de linfocitos T. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se fijaron en formaldehído al 2 % en PBS/BSA/NaN₃ durante 30 minutos a 4 °C. La unión de anticuerpos se midió usando citometría de flujo (FACSCalibur; BD Biosciences).

El anticuerpo quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 demostró tinción positiva en la subpoblación de linfocitos T CD4^{positivo} humanos activados por PHA, y baja tinción positiva en la subpoblación de linfocitos T CD8^{positivo} humanos activados por

PHA (datos no mostrados).

(c). Unión de anticuerpo monoclonal quimérico humana IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 en linfocitos T positivos para CD28 y positivos para CD4 que expresan CD134 humano estimulados con perlas estimuladoras de anticuerpos anti-CD3 humano/anti-CD28 humano

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de donantes sanos (consentimiento informado) por centrifugación de densidad en Lymphoprep (1,077 g/ml; Nycomed). Posteriormente, se estimularon 1×10^6 PBMC/ml en medio de cultivo RPMI - 1640 (Gibco) que contenía suero de ternero fetal 10 % (Bodinco) y gentamicina 50 µg/ml (Gibco) con perlas estimuladoras de anticuerpo de ratón anti-CD3 humano/de ratón anti-CD28 humano (perlas CD23/CD28; Invitrogen) a 1 perla/4 células en ausencia o presencia de interleucina-2 humana recombinante 25 U/ml (PeproTech) a 37 °C/CO₂ 5 % durante 1 día. Después del cultivo, las PBMC se recogieron y se pusieron a $1-2 \times 10^6$ células/ml en PBS/BSA/NaN₃ helado. Las células se incubaron con o sin 20,0 µg/ml de anticuerpo quimérico humano IgG4κ anti- CD134 humano clon 20E5 durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se incubaron posteriormente con anticuerpos de cabra anti-IgG humano (específicos de Fcγ) conjugados con PE diluido 1:200 (Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con anticuerpo de ratón anti-CD4 humano conjugado con FITC diluido 1:10 (BD Biosciences) o con anticuerpo de ratón anti-CD8 humano conjugado con FITC diluido 1:10 (BD Biosciences) para detectar subpoblaciones de linfocitos T. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se fijaron en formaldehído al 2 % en PBS/BSA/NaN₃ durante 30 minutos a 4 °C. La unión de anticuerpos se midió usando citometría de flujo (FACSCalibur; BD Biosciences).

Como se muestra en la Figura 14, el anticuerpo quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 demostró tinción positiva en la subpoblación de linfocitos T CD4^{positivo} humanos activados por perlas CD3/CD28 y tinción positiva baja en la subpoblación de linfocitos T CD8^{positivo} humanos activados por perlas CD3/CD28. No se observó efecto aparente usando complemento de IL-2 humana recombinante.

Ejemplo 7. Caracterización biológica del anticuerpo monoclonal quimérico humano IgG4/kappa anti-CD134 humano clon 20E5

(a). Proliferación de linfocitos T que expresan CD134 humano estimulados con PHA después del tratamiento con el anticuerpo monoclonal quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5

Se generaron linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA (10 µg/ml durante 1 día; véase anteriormente). Las células se recogieron y suspendieron a 2×10^6 células/ml en medio de cultivo RPMI (Gibco) que contenía suero de ternero fetal al 10 % (Bodinco) y gentamicina 50 µg/ml (Gibco). Las células se sembraron a $0,1 \times 10^6$ células/100 µl/pocillo (es decir, 1×10^6 células/ml) en placas de fondo plano de 96 pocillos

(Corning) y se expusieron a anticuerpo quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 25,0 µg/ml o a anticuerpo humano IgG4κ anti-CD40 humano de control 25,0 µg/ml (PG102; PanGenetics), o a OX40L humano recombinante marcado con polihistidina 1,0 µg/ml (en presencia de una relación molar 1:5 de anticuerpo de ratón anti-polihistidina; R & D Systems) a 37 °C/CO₂ 5 % durante 6 días. Después de 6 días, la proliferación celular se midió usando el ELISA™ de proliferación celular colorimétrico (incorporación de BrdU) (Roche) y un lector de ELISA (BioRad) a A450 nm.

Como se muestra en la Figura 15 (media ± DT), el anticuerpo quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 (hu20E5) y OX40L humano indujeron proliferación en linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA. Sin tratamiento (solamente medio) o el tratamiento con anticuerpo humano IgG4κ anti- CD40 humano de control (huIgG4) no demostraron ningún efecto en la proliferación de linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA.

(b). Proliferación de linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA después del tratamiento con el anticuerpo monoclonal quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 en combinación con OX40L humano recombinante

Se generaron linfocitos T que expresaban CD234 humano estimulados con PHA (10 µg/ml durante 1 día; véase anteriormente). Las células se recogieron y se suspendieron a 2x10⁶ células/ml en medio de cultivo RPMI (Gibco) que contenía suero de ternero fetal 10 % (Bodinco) y gentamicina 50 µg/ml (Gibco). Las células se sembraron a 0,1x10⁶ células/100 µl/pocillo (es decir, 1x10⁶ células/ml) en placas de fondo plano de 96 pocillos (Corning) y se expusieron a 0, 0,025, 0,25, 2,5 o 25,0 µg/ml de anticuerpo quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 y/o en combinación con 0, 0,01, 0,1, o 1,0 µg/ml de OX40L humano recombinante marcado con polihistidina (en presencia de una relación molar de 1:5 del anticuerpo anti- polihistidina de ratón; R & D Systems) a 37 °C/CO₂ 5% durante 6 días. Después de 6 días, se midió la proliferación celular usando el ELISA™ de proliferación celular colorimétrico (incorporación de BrdU) (Roche) y un lector de ELISA (BioRad) a A450 nm.

Como se muestra en la Figura 16 (media ± DT), el anticuerpo quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 (hu20E5) y OX40L humano indujeron de forma dependiente de la dosis la proliferación en linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA. El anticuerpo quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 indujo de forma dependiente del donante proliferación a 2,5 y 25 µg/ml (donante 1) o a 0,25, 2,5 y 25 µg/ml (donante 2). Además, OX40L humano indujo de forma dependiente del donante proliferación a 0,1 y 1,0 µg/ml (donante 1) o a 0,01, 0,1 y 1,0 µg/ml (donante 2).

Como se muestra en la Figura 17 (media ± DT), la combinación del anticuerpo quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 (hu20E5) a 2,5 y 25 µg/ml (o a concentraciones menores, datos no mostrados) con OX40L humano a 0,1 y 1,0 µg/ml (o a concentraciones menores, datos no mostrados) no demostraron ningún efecto recíproco (es

decir, sinérgico o aditivo, o incluso inhibidor) en la proliferación en linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA.

(c). *Proliferación de linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con perlas estimuladoras de anticuerpo anti-CD3 humano/anti-CD28 humano después del tratamiento con el anticuerpo monoclonal quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5*

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de donantes sanos (consentimiento informado) por centrifugación de densidad en Lymphoprep (1,077 g/ml; Nycomed). Posteriormente, se sembraron PBMC a $0,1 \times 10^6$ células/100 µl/pocillo (es decir, 1×10^6 células/ml) en placas de fondo plano de 96 pocillos (Corning) en medio de cultivo RPMI - 1640 (Gibco) que contenía suero de ternero fetal al 10 % (Bodinco) y gentamicina 50 µg/ml (Gibco), y se estimularon con perlas estimuladoras de anticuerpo de ratón anti-CD3 humano/de ratón anti-CD28 humano (perlas CD3/CD28; Invitrogen) a 1 perla/2 células en ausencia o presencia de interleucina-2 humana recombinante 25 U/ml (PeproTech) a 37 °C/CO₂ 5%. Después de 1 día o después de 2 días, estos linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulado por perlas CD3/CD28 (sin y con interleucina-2) se expusieron a 25,0 µg/ml de anticuerpo quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 o a OX40L humano recombinante marcado con polihistidina 1,0 µg/ml (en presencia de una relación molar 1:5 de anticuerpo de ratón anti-polihistidina; R & D Systems) a 37 °C/CO₂ 5% durante 6 días o durante 5 días, respectivamente. Las células, que se estimularon inicialmente con combinación de perlas CD3/CD28 más interleucina-2 humana recombinante, se volvieron a estimular 1 día antes de las mediciones de proliferación celular con 25 U/ml de interleucina-2 humana recombinante. Después de 6 días o después de 5 días de exposición al anticuerpo quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 o a OX40L humano, se midió la proliferación celular usando ELISA™ de proliferación celular colorimétrico (incorporación de BrdU) (Roche) y un lector de ELISA (BioRad) a A450 nm.

Como se muestra en la Figura 18 (media ± DT, n = 3, usando un donante), aunque las perlas estimuladoras CD3/CD28 por sí solas indujeron proliferación considerable en linfocitos T que expresaban CD134 humano (es decir, medio), el anticuerpo quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 (hu20E5) y OX40L humano indujeron proliferación adicional en linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con perlas CD3/CD28. La adición de interleucina-2 solamente parecía potenciar la proliferación basal (es decir, medio) en linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con perlas CD3/CD28.

(d). *Respuestas inmunoestimuladoras en macacos rhesus después del tratamiento con anticuerpos humanos (quiméricos) anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5*

Pueden inmunizarse los primates no humanos macacos rhesus con la proteína del virus de la inmunodeficiencia de simios, gp130, como se describe en Weinberg *et al.* (J Immunother 2006; 29: 575-585).

Se esperaba que los ganglios linfáticos de drenaje de monos inmunizados tratados

con los anticuerpos humanos (por ejemplo, quiméricos o humanizados o desinmunizados; por ejemplo, subclase IgG1 o IgG4 humana) anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5 mostraran ganglios linfáticos agrandados en comparación con monos inmunizados de control. Se espera que los monos tratados con anticuerpos humanos (por ejemplo, quiméricos, humanizados o desinmunizados) anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5 muestren mayores títulos de anticuerpo específicos de gp130, y mayores respuestas de células T de larga duración, en comparación con los controles. No debería haber señales evidentes de toxicidad en monos tratados con anticuerpo anti-CD134 humano clon 12H3 o tratados con el clon 20E5 (por ejemplo, quimérico, humanizado o desinmunizado).

Ejemplo 8. Caracterización de los dominios CD134 humanos y epítomos reconocidos por anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5

(a). Unión de los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5 con proteína de fusión de FC γ humano:CD134 humano recombinante reducida y no reducida (transferencia de Western)

Se sometieron a electroforesis mil trescientos o 650 ng/carril (para tinción de azul brillante de Coomassie) o 250 ng/carril (para transferencia de Western) de proteína de fusión Fc γ humano: CD134 humano recombinante (IgG1) (R & D Systems) usando geles tris-bis 4-12 % y tampón de ejecución MOPS (Invitrogen) en una diversidad de condiciones reductoras y no reductoras (véase Figura 19-A) en el sistema Novex® NuPage® de electroforesis desnaturizante de LDS-PAGE premoldeada. Después, se tiñó la proteína de fusión Fc γ humano: CD134 humano recombinante con azul brillante de Coomassie (BioRad) o se electrotransfirió a una membrana de transferencia de fluoruro de polivinilideno (PDVF) (Millipore). Después de bloquear con PBS/Tween 20 0,05%/fracción V de BSA 1% (Roche) durante 20 minutos a TA, las membranas de PDVF se incubaron con 100 ng/ml del anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 o 20E5 durante 1 hora a TA. En paralelo, se usó el anticuerpo de control de isotipo IgG1 κ de ratón 100 ng/ml (BD Biosciences) como un control negativo. Después de lavado exhaustivo en PBS/Tween 20 0,05%, se determinó la unión del anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 o 20E5 con anticuerpos de cabra específicos anti-Fc γ de ratón conjugados con peroxidasa de rábano rusticano diluido 1:5000 (Jackson ImmunoResearch) durante 1 hora a TA, seguido de una solución lista para usar de sustrato TMB (Sigma) para detección colorimétrica.

Como se muestra en la Figura 19-B, la proteína de fusión FC γ humano: CD134 humano recombinante en condiciones no reductoras (y desnaturizantes de LDS sin y con desnaturalización por calor, condición a y b, respectivamente) demostró una masa molecular de aproximadamente 130-140 kDa. La no reducción sin calentamiento (condición a) mostró dos bandas en proximidad estrecha, lo que sugiere que una fracción de la proteína de fusión Fc γ humano: CD134 humano recombinante estaba incompletamente desnaturizada/desplegada. La no reducción con calentamiento (condición b) mostró una banda, lo que sugirió que la proteína de fusión Fc γ humano: CD134 humano recombinante

estaba completamente desnaturalizada/desplegada. La proteína de fusión Fcγ humano: CD134 humano recombinante en condiciones reductoras (y desnaturalizantes de LDS sin y con desnaturalización por calor, condición c y d, respectivamente) dio como resultado bandas a aproximadamente 110 kDa (condición c) y a aproximadamente 60-65 kDa (condición d). Una observación anterior sugirió una reducción incompleta de la proteína de fusión Fcγ humano: CD134 humano recombinante, y una observación posterior sugirió reducción/degradación completa de los enlaces disulfuro que unían dos fragmentos de Fcγ derivados de IgG1 humana dentro de cada molécula de proteína de fusión Fcγ humano: CD134 humano recombinante.

Como se muestra en la Figura 19-C, tanto el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 como el clon 20E5 reconocieron la proteína de fusión Fcγ humano: CD134 humano recombinante en condiciones no reductoras (y desnaturalizantes de LDS sin y con desnaturalización por calor, condición a y b, respectivamente) a predominantemente aproximadamente 130 kDa. Por el contrario, el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 mostró solamente una ligera unión con la proteína de fusión Fcγ humano: CD134 humano recombinante en condiciones reductoras (y desnaturalizantes de LDS, sin y con desnaturalización por calor, condición c y d, respectivamente), mientras que el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 mostró una fuerte unión con la proteína de fusión Fcγ humano: CD134 humano recombinante en condiciones reductoras (y desnaturalizantes de LDS sin y con desnaturalización por calor, condición c y d, respectivamente).

Estos resultados demostraron que los anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 y clon 20E5 reconocían específicamente CD134 humano. Además, estos resultados mostraron que los anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 y clon 20E5 parecían reconocer epítopos CD134 humanos diferentes, lo que se demuestra por unión ligera (clon 12H3) frente a unión fuerte (clon 20E5) respectivas con la proteína de fusión Fcγ humano: CD134 humano recombinante en condiciones reductoras (y desnaturalizantes de LDS con y sin desnaturalización por calor). Estos resultados sugieren que el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 reconocía un epítipo en CD134 humano, que no es sensible a desnaturalización (LDS y tratamiento por calor) y sensible a la reducción (es decir, degradación de enlace o enlaces disulfuro, más probablemente relacionados con dominios ricos en cisteína (DRC), por DTT). Estos resultados sugirieron que el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 reconocía un epítipo en CD134 humano, que no era sensible a desnaturalización (LDS y tratamiento por calor) y no era sensible a reducción (es decir, degradación del enlace o los enlaces disulfuro, más probablemente relacionados con DRC, por DTT).

(b). Unión de los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5 con la construcción de CD134 humana de longitud completa y diversas construcciones de CD134 humano truncadas expresadas en la línea celular 293-F (mapeo de dominios)

Para analizar la especificidad fina de los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5, se determinó la localización del epítipo o los epítomos reconocidos por los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5 por mapeo de dominios. La capacidad de los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5 para unirse con construcciones de CD134 humano truncadas, expresadas en la superficie de células 297-F (derivados de HEK) se determinó por análisis de FACS.

Basándose en la bibliografía (Swiss- Prot: P43489.1; Latza *et al* Eur J Immunol 1994; 24: 677-683; Bodmer *et al.* Trends Biochem Sci 2002; 27: 19-26; Compaan *et al.* Structure 2006; 14: 1321-1330; patente de Estados Unidos 2011/0028688 A1), se identificaron dominios ricos en cisteína (DRC) y una estructura de tipo bisagra en la región extracelular de CD134 humano. Los DRC se codifican DRC1, DRC2, (truncado) DRC3, (truncado) DRC4 (véase Figura 20). Los DRC contienen tipos de módulos topológicamente distintos, denominados un módulo A y un módulo B (véase también Figura 20). Los módulos A son estructuras en forma de C, y los módulos B son estructuras en forma de S. Un DRC típico está compuesto habitualmente de módulos A1-B2 o módulos A2- B1 (o, menos frecuentemente, un par diferente de módulos, como A1-B1) con 6 restos de cisteína conservados, en que el numeral indica el número de enlaces disulfuro dentro de cada módulo (véase también Figura 20). Como se muestra en la Figura 20, se generaron y se expresaron 5 construcciones de CD134 humano diferentes: (1) construcción de CD134 humano de longitud completa, que comienza con DRC1 en el extremo N-terminal (es decir, el módulo A1-B2 de CDR1 abarca los aminoácidos 29-65), y por lo tanto se indica como “DRC1”, y comprendía los aminoácidos 1-277 (véase SEC ID N° 1), (2) construcción “DRC2”, que comienza con DRC2 N-terminal (es decir, el módulo A1-B2 de DRC2 abarca los aminoácidos 66-107), y comprendía los aminoácidos 66-277 unidos con los aminoácidos del péptido señal 1-28 (véase SEC ID N° 30), (3) construcción “DRC3”, que comienza con DRC3 N terminal (es decir, el módulo A1-B1 de DRC3 abarca los aminoácidos 108-146 (de acuerdo con Compaan *et al.* Structure 2006; 14: 1321-1330) o el módulo A1 de DRC3 truncado abarca los aminoácidos 108-126 (de acuerdo con Latza *et al* Eur J Immunol 1994; 24: 677-683)), y comprendía los aminoácidos 108-277 unidos con los aminoácidos del péptido señal 1-28 (véase SEC ID N° 31), (4) construcción “DRC4”, que consiste en módulo B1 de subdominio DRC3 o DRC4 N-terminal/módulo B1 de DRC4 truncado (es decir, el módulo A1-B1 de DRC4 abarca los aminoácidos 127-167 (Latza *et al.* Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) o una combinación (no mostrada en la Figura 20) del módulo B1 del subdominio DRC3 con el módulo A1 de DRC4 truncado abarca los aminoácidos 127-146 con los aminoácidos 147-167, respectivamente (Compaan *et al.* Structure 2006; 14: 1321-1330), y comprendía los aminoácidos 127-277 unidos con aminoácidos del péptido señal 1-28 (véase SEC ID N° 32) y (5) construcción “DRC4 truncada (TC)”, que consiste en módulo B1 de subdominio DRC4 o DRC truncado N terminal (es decir, el módulo A1 de DRC4 truncado abarca los aminoácidos 147-167

(Compaan *et al.* Structure 2006; 14: 1321-1330) o el módulo B1 del subdominio DRC4 (no mostrado en la Figura 20; Latza *et al* Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) abarca los aminoácidos 147-167) y comprendía los aminoácidos 147-277 unidos con los aminoácidos de péptidos señal 1-28 (véase SEC ID N° 33). Por PCR de ensamblaje usando ADN
5 polimerasa Pfx Accuprime™ (Invitrogen), se generaron estas 5 construcciones de CD134 humano usando cebadores mostrados en la siguiente tabla:

Nº de cebador*	Secuencia	SEC ID		
		Nº	Dirección	Gen
362	CTCGGATCCGCCACCATGTGCGTG	51	sentido	Líder CD134
363	AGAATTCTTATTAGATCTTGCCA	55	antisentido	Extremo CD134
364	ACTGTCACTGGACCCTGCGGTCCC	52	sentido	DRC2
365	GGGACCGCAGGGTCCAGTGACAGT	53	antisentido	DRC2
366	ACTGTCACTGGAAGGTGCAGGGCT	54	sentido	DRC3
367	AGCCCTGCACCTTCCAGTGACAGT	56	antisentido	DRC3
368	ACTGTCACTGGACCCTGCCCCCCT	57	sentido	DRC4
369	AGGGGGGCAGGGTCCAGTGACAGT	58	antisentido	DRC4
370	ACTGTCACTGGATGCACCCTGGCT	59	sentido	DRC4 truncado
371	AGCCAGGGTGCATCCAGTGACAGT	60	antisentido	DRC4 truncado

* Nº de cebador de acuerdo con el sistema de codificación interna de Bioceros

Brevemente, se amplificaron el ADNc que codifica los aminoácidos 1-28 del péptido señal y el ADNc que codifica los aminoácidos 66-277 de CD134 humano usando respectivamente el par de cebadores 362/365 y 364/363 en una reacción de PCR con CD134 humano de longitud completa como un molde. Posteriormente, se generó una construcción “DRC2” usando estos dos productos de PCR en una PCR de ensamblaje usando el par de cebadores 362/363. El ADNc que codificaba la construcción “DRC 2” se subclonó en un plásmido de expresión derivado de pcDNA3.1 usando sitios de restricción adecuados. De forma similar, se generaron construcción “DRC3” (aminoácidos 1-28 del péptido señal unidos con los aminoácidos 108-277 de CD134 humano), la construcción “DRC4” (aminoácidos 1-28 del péptido señal unidos con los aminoácidos 127 -277) y la construcción “DRC4 truncado” (aminoácidos 1-28 del péptido señal unidos con los aminoácidos 147-277) y se subclonaron en plásmidos de expresión derivados de pcDNA3.1 usando los cebadores correspondientes mostrados en la tabla anteriormente mencionada. Además, también se volvió a clonar CD134 humano de longitud completa (SEC ID Nº 1) en un plásmido de expresión derivado de pcDNA3.1.

Usando el Sistema de Expresión FreeStyle™ 293 (Invitrogen), se transfectaron de forma transitoria células 293-F FreeStyle™ (Invitrogen) con las 5 variantes generadas de CD134 humano. Después de 48-72 horas, se analizó la expresión de CD134 humano en superficie en células transfectadas por análisis de FACS. Para este fin, se recogieron células transfectadas y se pusieron a 1-2x10⁶ células/ml en PBS/BSA/NaN₃ helado. Las células se incubaron con 20,0 µg/ml de los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5 durante 30 minutos a 4 °C. En paralelo, se usó anticuerpo de control de isotipo IgG1κ de ratón 20,0 µg/ml (BD Biosciences) como un control negativo. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se incubaron posteriormente con anticuerpos de cabra anti IgG de ratón (específicos de Fcγ) conjugados con PE diluidos 1:200 (Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se fijaron en formaldehído al 2% en PBS/BSA/NaN₃ durante 30 minutos a 4 °C. La unión de los anticuerpos se midió usando citometría de flujo (FACSCalibur; BD Biosciences).

Como se muestra en la figura 21, los anticuerpos de ratón anti-CD134 humanos clones tanto 12H3 como 20E5 reconocieron CD134 humano de longitud completa (indicado como construcción “DRC1”) en células 293-F transfectadas, mientras que los

anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clones tanto 12H3 como 20E5 no mostraron unión en células 293-F transfectadas con simulación. Además, los anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5 reconocieron variantes de CD134 humano truncadas que carecían de DRC1 y DRC1-DRC2 (indicadas como construcción “DRC2” y construcción “DRC3”, respectivamente) en células 293-F transfectadas. Por el contrario, la unión del anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 contra variante de CD134 humano truncada que carecía de DRC1-DRC2- módulo A1 de DRC3 truncado (indicada como construcción “DRC4”) será muy débil, y la unión del anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 contra la variante de CD134 humano truncada que carecía de DRC1-DRC2-módulo A1 de DRC3 truncado-módulo A1 de subdominio DRC4 (de acuerdo con la definición de Latza *et al.* Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) o como alternativa DRC1-DRC2-módulo A1-B1 de DRC3 (de acuerdo con la definición de Compaan *et al.* Structure 2006; 14: 1321-1330; indicada como construcción “tcDRC4”) estaba completamente ausente, mientras que el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 mostró una fuerte unión contra la variante de CD134 humano truncada que carecía de DRC1-DRC2- módulo A1 de DRC3 truncado (indicado como construcción “DRC4”) y contra la variante de CD134 humano truncada que carecía de DRC1-DRC2-módulo A1 de DRC3 truncado- módulo A1 de subdominio DRC4 (de acuerdo con la definición de Latza *et al.* Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) o como alternativa DRC1-DRC2-módulo A1-B1 de DRC3 (de acuerdo con la definición de Compaan *et al.* Structure 2006; 14: 1321-1330; indicada como construcción “tcDRC4”).

Estos resultados demostraron que los anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5 reconocían específicamente CD134 humano (comparación de transfección con CD134 humano de longitud completa frente a transfección de simulación). Además, estos resultados demostraron que los anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5 parecía reconocer epítomos CD134 humanos diferentes, lo que se demuestra por falta de unión (usando clon 12H3) frente a unión fuerte (usando clon 20E5) respectiva con variante de CD134 humano truncada que carecía de DRC1-DRC2-módulo A1 de DRC3 truncado (indicado como construcción “DRC4”) y con variante de CD134 humano truncada que carecía de DRC1-DRC2-módulo A1 de DRC3 truncado-módulo A1 de subdominio DRC4 (de acuerdo con la definición de Latza *et al.* Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) o como alternativa DRC1-DRC2-módulo A1-B1 de DRC3 (de acuerdo con la definición de Compaan *et al.* Structure 2006; 14: 1321-1330; indicado como construcción “tcDRC4”). Estos resultados demostraron que el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 no parecía reconocer un epítomo CD134 humano en DRC1 y DRC2, y el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 no parecía reconocer un epítomo CD134 humano en DRC1, DRC2 y módulo A1 de DRC3 truncado-módulo A1 de subdominio DRC4 (de acuerdo con la definición de Latza *et al.* Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) o como alternativa DRC1-DRC2-módulo A1-B1 de DRC3 (de acuerdo con la definición de Compaan *et al.* Structure 2006; 14: 1321-1330). Estos resultados demostraron que el

anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 parecía reconocer un epítipo lineal o no lineal/conformacional en el módulo A1 de DRC3 truncado (de acuerdo con la definición de Latza *et al.* Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) con la secuencia de aminoácidos 108-126 (es decir, el péptido de 19 unidades RCRAFTQPLDSYKPGVDCA; véase SEC ID N°: 34) en CD134 humano extracelular o la secuencia de aminoácidos 108-126 (es decir, el péptido de 19 unidades RCRAFTQPLDSYKPGVDCA; véase SEC ID N°: 34) formaba una parte crucial para la unión con un epítipo no lineal/conformacional en módulo A1 de DRC3 truncado/módulo A1-B1 de DRC4 (de acuerdo con la definición de Latza *et al.* Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), y posiblemente en la estructura de tipo bisagra, con la secuencia de aminoácidos 108-214 (véase SEC ID N°: 35) en CD134 humano extracelular. Estos resultados demostraron que el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 parecía reconocer un epítipo lineal o no lineal/conformacional en el módulo A1 de DRC4 truncado (de acuerdo con la definición de Compaan *et al.* Structure 2006; 14: 1321-1330), y posiblemente en la estructura de tipo bisagra, con la secuencia de aminoácidos 147-214 (SEC ID N°: 36), en CD134 humano extracelular.

Usando una cristalografía, Compaan *et al.* (Structure 2006; 14: 1321-1330) descubrieron recientemente la implicación crítica de DRC1, DRC2 (especialmente el bucle A1 y los restos inmediatamente siguientes), y DRC3 (principalmente el bucle A1) en CD134 humano durante la interacción con el Ligando OX40 (CD252)/CD134 (=OX40). Este descubrimiento concuerda bien con los hallazgos de los inventores de que (1, véase anteriormente) el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 no parecía reconocer un epítipo CD134 humano en DRC1, DRC2 y módulo A1 de DRC3 truncado-módulo A1 de subdominio DRC4 (de acuerdo con la definición de Latza *et al.* Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) o como alternativa DRC1-DRC2-módulo A1-B1 de DRC3 (de acuerdo con la definición de Compaan *et al.* Structure 2006; 14: 1321-1330) en CD134 humano extracelular, y (2, véase anteriormente) el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 se unía simultáneamente con OX40L humano en linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA. Esto sugirió que el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 20E5 reconocía un epítipo en CD134 humano, que no estaba implicado críticamente en la interacción de CD134 humano con OX40L humano. Además, los hallazgos de los inventores de que (1, véase anteriormente) en el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 parecía reconocer un epítipo lineal o no lineal/conformacional en el módulo A1 de DRC3 truncado (de acuerdo con la definición de Latza *et al.* Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) con la secuencia de aminoácidos 108-126 (es decir, el péptido de 19 unidades RCRAFTQPLDSYKPGVDCA; véase SEC ID N°: 34) en CD134 humano extracelular, o la secuencia de aminoácidos 108-126 (es decir, el péptido de 19 unidades RCRAFTQPLDSYKPGVDCA; véase SEC ID N°: 34) formaban una parte crucial para la unión con un epítipo no lineal/conformacional en el módulo A1 de DRC3 truncado/módulo A1-B1 de DRC4 (de acuerdo con la definición de Latza *et al.* Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), y posiblemente en la estructura de tipo bisagra, con la secuencia de aminoácidos

108-214 (véase SEC ID N°: 35) en CD134 humano extracelular y (2 véase anteriormente), el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 unido simultáneamente con OX40L humano en linfocitos T que expresaban CD134 humano estimulados con PHA, corroboraron la idea de que el epítipo (como se ha descrito anteriormente) en CD134 humano que se reconocía por el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 no estaba implicado de forma crítica en la interacción de CD134 humano con OX40L humano.

(c). *Mapeo de epítipos (1) del anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 usando ELISA de péptidos derivados de CD134 humano*

Para analizar adicionalmente la especificidad fina del anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3, se determinó la localización del epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 por mapeo de epítipos. La capacidad del anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 para unirse con un péptido derivado de CD134 humano, que se correspondía a la secuencia de aminoácidos de módulo A1 de DRC3 truncado-módulo A1 de subdominio de DRC4 (de acuerdo con la definición de Latza *et al.* Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), se determinó por ELISA.

Se recubrieron placas de ELISA de fondo plano de noventa y seis pocillos (Corning) con 10 ng/pocillo de péptido derivado de CD134 humano (sintetizado por Pepscan Presto, Lelystad, Países Bajos), que se correspondía con la secuencia de aminoácidos del módulo A1 de DRC3 truncado-módulo A1 de subdominio DRC4 (véase SEC ID N°: 38) o con 10 ng/pocillo del péptido de control derivado de fibronectina humana (sintetizado por Pepscan Presto, Lelystad, Países Bajos), que se correspondía con la secuencia de aminoácidos del dominio estructural de tipo III extra (véase SEC ID N°: 37) en PBS durante una noche a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/Tween 20 0,5%, las placas se bloquearon en PBS/Tween 20 0,05%/fracción V de BSA 1% (Roche) durante 1 hora a TA. Posteriormente, las placas se incubaron con 0, 0,00005 – 50,0 (etapas de dilución 10 veces en tampón de bloqueo) µg/ml de anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 o anticuerpo de control de isotipo IgG₁κ de ratón (BD Biosciences) durante 1 hora a TA. Después de lavado exhaustivo en PBS/Tween 20 0,05%, se determinó la unión de los anticuerpos con anticuerpos de cabra específicos de Fcγ anti IgG de ratón conjugados con peroxidasa de rábano rusticano diluidos 1:5000 (Jackson ImmunoResearch) durante 1 hora a TA, seguido de una solución lista para usar del sustrato de TMB (Invitrogen) para detección colorimétrica. Después de añadir H₂SO₄ 1M, se midieron las densidades ópticas a una longitud de onda de 450 nm (longitud de onda de referencia de 655 nm) usando un lector de microplacas (BioRad).

Como se muestra en la figura 23-A (n=1), el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 se unió de forma dependiente de dosis y específicamente al péptido derivado de CD134 humano, mientras que el anticuerpo de control de isotipo de IgG₁κ de ratón no demostró unión con el péptido derivado de CD134 humano. Tanto el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 como el anticuerpo de

control de isotipo IgG₁κ demostraron ausencia de unión con el péptido de control derivado de fibronectina humana.

Estos resultados demostraron que el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 reconocía específicamente un epítipo en CD134 humano (comparación de péptido derivado de CD134 humano frente a péptido de control derivado de fibronectina humana). Además, estos resultados demostraron que el anticuerpo de ratón anti-CD134 humano clon 12H3 parecía reconocer un epítipo lineal o no lineal/conformacional en el módulo A1 de DRC3 truncado-módulo A1 de subdominio DRC4 (de acuerdo con la definición de Latza *et al.* Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) con la secuencia de aminoácidos 108-146 (es decir, péptido de 39 unidades RCRAFTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTN; véase SEC ID N°: 38) en CD134 humano extracelular.

(d) Mapeo de epítipos (2) de los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5 usando Tecnología de Mapeo de Epítipos CLIPS por Pepscan

Puede usarse Tecnología de Mapeo de Epítipos CLIPS por Pepscan (Lelystad, Países Bajos) para determinar los epítipos reconocido por los anticuerpos de ratón anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5. Esta tecnología de CLIPS permite la determinación de epítipos lineales, conformaciones, discontinuos y complejos que implicaban complejos proteicos diméricos o multiméricos. Para este fin, la secuencia de aminoácidos lineal de CD134 humano = OX40 (SEC ID N°: 1) se usa como la proteína diana.

Ejemplo 9. Caracterización de los dominios y epítipos de CD134 humano reconocidos por los anticuerpos monoclonales quiméricos humanos IgG4/κ y/o IgG1/κ anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5

(a). Unión de los anticuerpos quiméricos humanos IgG4κ y/o IgG1κ anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5 con construcción de CD134 humano de longitud completa y diversas construcciones de CD134 humano truncadas en la línea celular 293-F (mapeo de dominios).

Para analizar la especificidad fina de los anticuerpos monoclonales quiméricos humanos IgG4κ y/o IgG1κ anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5, se determinó la localización del epítipos o los epítipos reconocidos por los anticuerpos monoclonales quiméricos humanos IgG4κ y/o IgG1κ anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5 por mapeo de dominios. La capacidad de los anticuerpos monoclonales humanos quiméricos IgG4κ y/o IgG1κ anti-CD134 humano clones 12H3 y 20E5 para unirse con las construcciones de CD134 humano truncadas (véase Ejemplo 8 (b) anterior), expresadas en la superficie de células 297-F (derivadas de HEK), se determinó por análisis de FACS.

Usando el Sistema de Expresión FreeStyleTM 293 (Invitrogen), se transfectaron de forma transitoria células 293-F FreeStyleTM (Invitrogen) con las 5 variantes generadas de CD134 humano (véase anteriormente). Después de 48-72 horas, se analizó la expresión de CD134 humano en superficie en células transfectadas por análisis de FACS. Para este fin, se recogieron células transfectadas y se pusieron a $1-2 \times 10^6$ células/ml en PBS/BSA/NaN₃ helado. Las células se incubaron con o sin anticuerpos monoclonales quiméricos humanos

IgG4κ y/o IgG1κ anti-CD134 humano 20,0 μg/ml clones 12H3 y 20E5 durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se incubaron posteriormente con anticuerpos de cabra anti IgG humano conjugados con PE diluido 1:200 (específicos de Fcγ) (Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/BSA/NaN₃, las células se fijaron en formaldehído al 2% en PBS/BSA/NaN₃ durante 30 minutos a 4 °C. La unión de los anticuerpos se midió usando citometría de flujo (FACSCalibur; BD Biosciences).

Como se muestra en la figura 22, tanto el anticuerpo monoclonal quimérico humano IgG4κ e IgG1κ anti-CD134 humano clon 12H3 como el anticuerpo monoclonal quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 20E5 demostraron características de unión contra diversas construcciones de CD134 humano truncadas en células transfectadas, que eran idénticas a las características de unión de sus anticuerpos de ratón anti-CD134 humano parentales clones 12H3 y 20E5 correspondientes homólogos (véase Ejemplo 8(b) anterior; para comparación, véase figura 22 frente a figura 21).

(b). Mapeo de epítomos de anticuerpo monoclonal quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 12H3 usando ELISA de péptidos derivados de CD134 humano

Para analizar adicionalmente la especificidad fina del anticuerpo monoclonal quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 12H3, se determinó la localización del epítopo reconocido por el anticuerpo monoclonal quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 12H3 por mapeo de epítomos. La capacidad del anticuerpo monoclonal quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 12H3 para unirse con un péptido derivado de CD134 humano, que correspondía a la secuencia de aminoácidos del módulo A1 de DRC3 truncado-módulo A1 de subdominio DRC4 (de acuerdo con la definición de Latza *et al.* Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), se determinó por ELISA.

Se recubrieron placas de ELISA de fondo plano de noventa y seis pocillos (Corning) con péptido derivado de CD134 humano 10 ng/pocillo (sintetizado por Pepscan Presto, Lelystad, Países Bajos), que correspondían a la secuencia de aminoácidos de módulo A1 de DRC3 truncado-módulo A1 de subdominio DRC4 (véase SEC ID N°: 38) o con 10 ng/pocillo de péptido de control derivado de fibronectina humana (sintetizado por Pepscan Presto, Lelystad, Países Bajos), que se correspondía con la secuencia de aminoácidos del dominio estructural de tipo III extra (véase SEC ID N°: 37) en PBS durante una noche a 4 °C. Después de lavado exhaustivo en PBS/Tween 20 0,5%, las placas se bloquearon en PBS/Tween 20 0,05%/fracción V de BSA 1% (Roche) durante 1 hora a TA. Posteriormente, las placas se incubaron con 0, 0,00005 – 50,0 (etapas de dilución 10 veces en tampón de bloqueo) μg/ml de anticuerpo monoclonal quimérico humano IgG4κ CD134 humano clon 12H3 o anticuerpo de control humano IgG4κ anti CD40 humano (Biocult) durante 1 hora a TA. Después de lavado exhaustivo en PBS/Tween 20 0,05%, se determinó la unión de anticuerpos con anticuerpos específicos de Fcγ anti IgG humano de cabra conjugados con peroxidasa de rábano rusticano diluida 1:5000 (Jackson ImmunoResearch) durante 1 hora a TA, seguido de una solución lista para usar del sustrato de TMB

(Invitrogen) para detección colorimétrica. Después de añadir H₂SO₄ 1M, se midieron las densidades ópticas a una longitud de onda de 450 nm (longitud de onda de referencia de 655 nm) usando un lector de microplacas (BioRad).

Como se muestra en la figura 23-B (n=1), el anticuerpo monoclonal quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 12H3 se unía de forma dependiente de dosis y específicamente al péptido derivado de CD134 humano, mientras que el anticuerpo de control humano IgG4κ anti CD40 humano no demostró ninguna unión con el péptido derivado de CD134 humano. Ni el anticuerpo monoclonal quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 12H3 ni el anticuerpo de control humano IgG4κ anti CD40 humano demostraron ninguna unión con péptido de control derivado de fibronectina humana.

Estos resultados demostraron que el anticuerpo monoclonal quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 12H3 reconocía específicamente un epítipo en CD134 humano (comparación de péptido derivado de CD134 humano frente a péptido de control derivado de fibronectina humana). Además, estos resultados demostraron que el anticuerpo monoclonal quimérico humano IgG4κ anti-CD134 humano clon 12H3 parecía reconocer un epítipo lineal o no lineal/conformacional en el módulo A1 de DRC3 truncado-módulo A1 de subdominio DRC4 (de acuerdo con la definición de Latza *et al.* Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) con la secuencia de aminoácidos 108-146 (es decir, péptido de 39 unidades RCRAQTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTN; véase SEC ID N°: 38) en CD134 humano extracelular.

La lista de secuencias adjunta forma parte de la presente memoria descriptiva.

En SEC ID N°: 1, que es la secuencia de aminoácidos de CD134 humano (GenBank ref CAB96543.1; aa 1-277) un péptido señal está en los aminoácidos (aa) 1-28) y una región transmembrana en los aminoácidos 215-235.

SEC ID N°: 61, que forma los 11 aminoácidos N terminales de SEC ID N°: 5, también es de interés. Este es el equivalente de cadena ligera de 20E5 de SEC ID N°: 3, que es los 11 aminoácidos N terminales de la cadena pesada de 20E5.

SEC ID N°: 37 (TYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQGGC), secuencia de aminoácidos del péptido derivado de fibronectina humana, corresponde a la secuencia de aminoácidos del dominio estructural de tipo III extra (ED1; Peters *et al.* Am Rev Resp Dis 1988; 138: 167-71).

REIVINDICACIONES

1.- Una molécula de unión que se une a CD134 humano, caracterizada porque la molécula de unión no evita la unión del receptor CD134 humano (OX40) al ligando de OX40 (OX40L); en donde la molécula de unión comprende una región variable de cadena pesada que comprende:

(a) una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 14;

(b) una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:15;

(c) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 16;

y en donde la molécula de unión comprende una región variable de cadena liviana que comprende:

(d) una CDR1 de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17;

(e) una CDR2 de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:18;

(f) una CDR3 de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 19.

2.- Una molécula de unión de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 12; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 13.

3.- Una molécula de unión según la reivindicación 1 o 2, que es un anticuerpo humano, o es un anticuerpo quimérico, humanizado o DelmmunizedTM.

4.- Una molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la molécula de unión es un anticuerpo IgM, IgD, IgG, IgA o IgE.

5.- Una molécula de unión de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG.

6.- Una molécula de unión según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la molécula de unión es un anticuerpo monoclonal.

7.- Una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de unión según una

cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

8.- Un vector de expresión que comprende al menos una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7.

5

9.- Una célula hospedadora que comprende un vector según la reivindicación 8, en donde dicha célula hospedadora es seleccionada del grupo que consiste de células de ovario de hámster chino (CHO), células NSO, células PER-C6, células SP2, células HEK-293T, células NIH-3T3, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono verde africano (COS), células de carcinoma hepatocelular humano, células de pulmón humanas, células A549, células Sf9 o células Sf21.

10

10.- Un proceso para preparar una molécula de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende las etapas de (i) preparar moléculas de unión a CD134 y (ii) explorar dichas moléculas para identificar y obtener moléculas de unión que no impidan la unión de OX40L a CD134.

15

11.- Un proceso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dichas moléculas de unión a CD134 son identificadas luego de la exposición del CD134 a una concentración saturada de OX40L.

20

12.- Un proceso según la reivindicación 10 o la reivindicación 11 caracterizado por que la molécula de unión es un anticuerpo monoclonal y comprende inmunizar un animal con CD134 humano, preparar hibridomas que secreten anticuerpos anti-CD134 e identificar hibridomas que produzcan anticuerpos anti-CD134.

25

30

35

40

RESUMEN

La invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a CD134 humano. Los anticuerpos anti-CD134 humano de la invención se unen específicamente al dominio extracelular de CD134 humano, incluyendo dominios que no se unen al ligando de OX40 (OX40L) en CD134 humano, que se expresa por ejemplo en linfocitos T CD4 y/o CD8 efectores (Tefs) convencionales humanos activados y en linfocitos T CD4 reguladores (Tregs) supresores humanos activados. Los anticuerpos anti-CD134 humano de la invención son útiles (por ejemplo, para potenciar la función efectora anticancerosa de Tefs y/o para inhibir la función supresora de Tregs) para el tratamiento contra el cáncer.

Figura 1

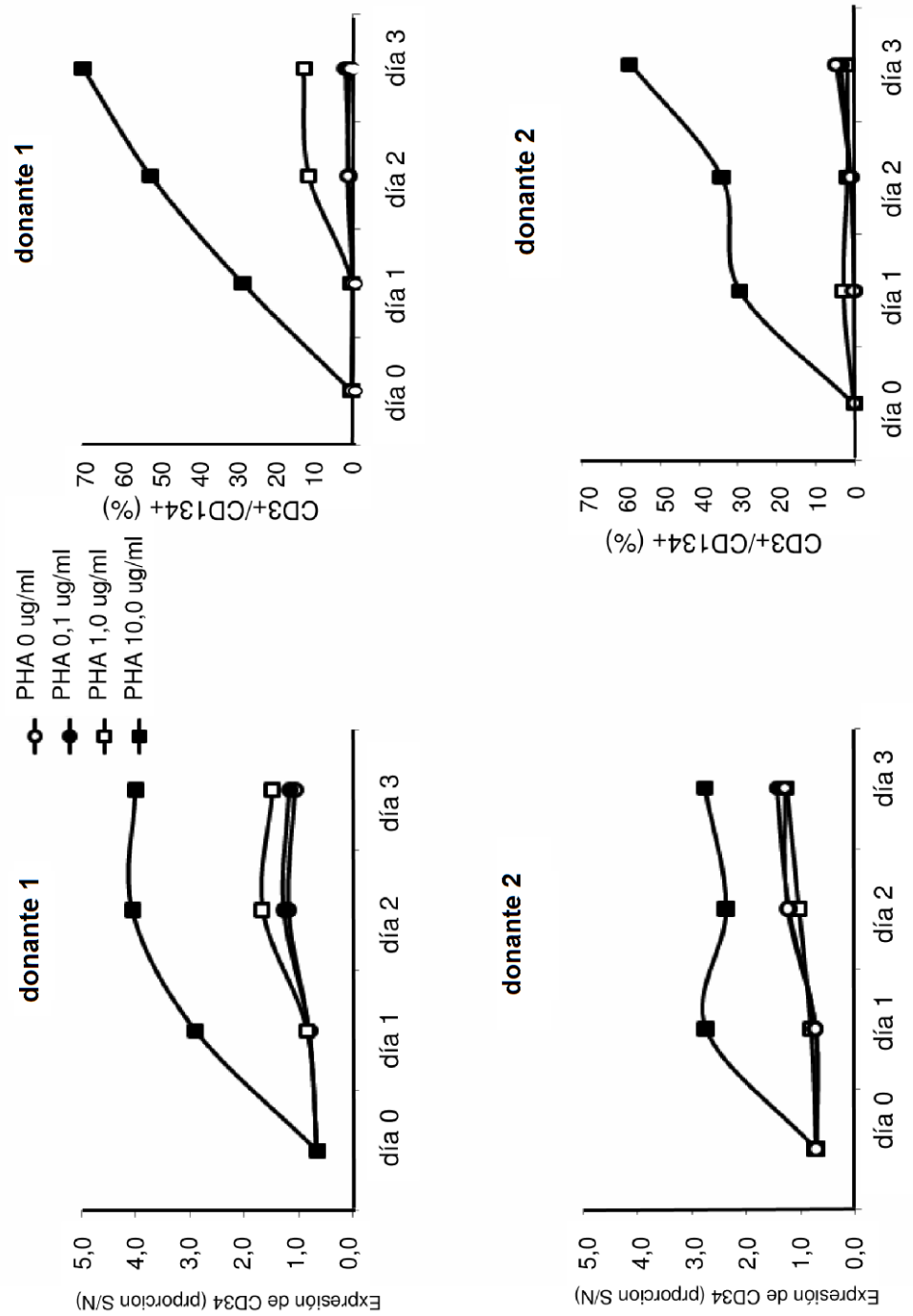
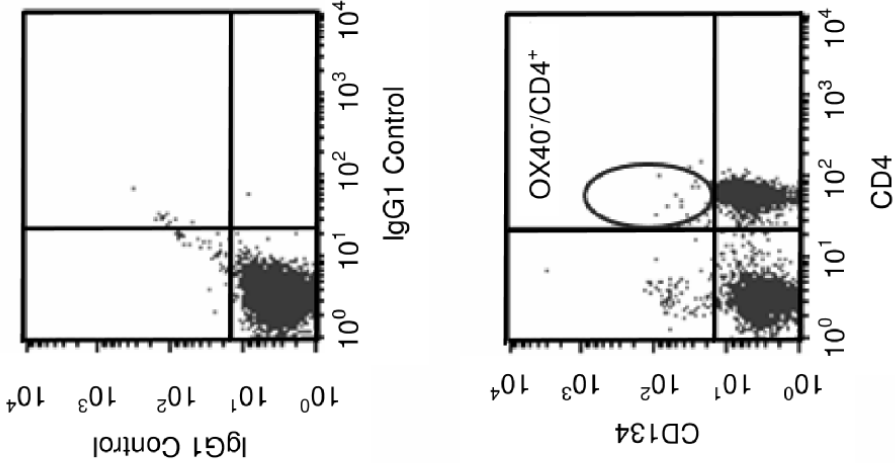
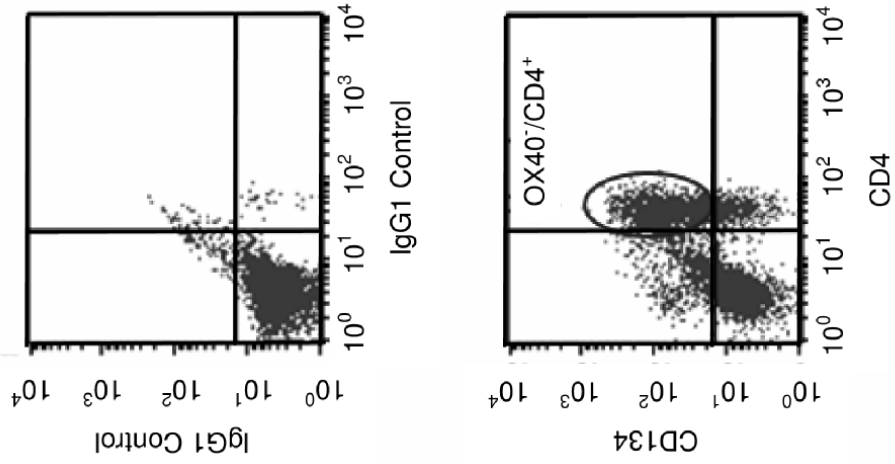


Figura 2

Células T CD4 en reposo



Células T CD4 estimuladas/activadas por PHA



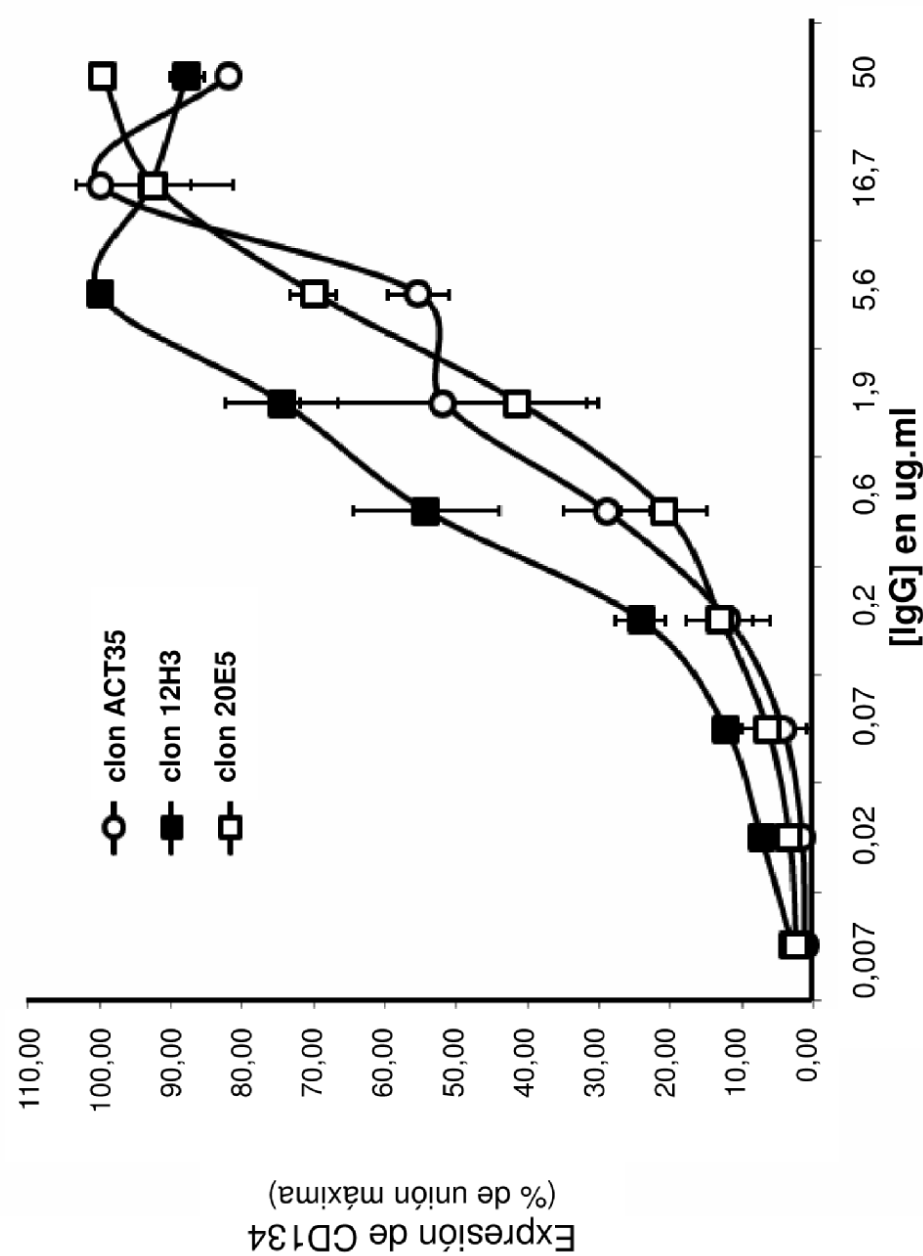


Figura 3

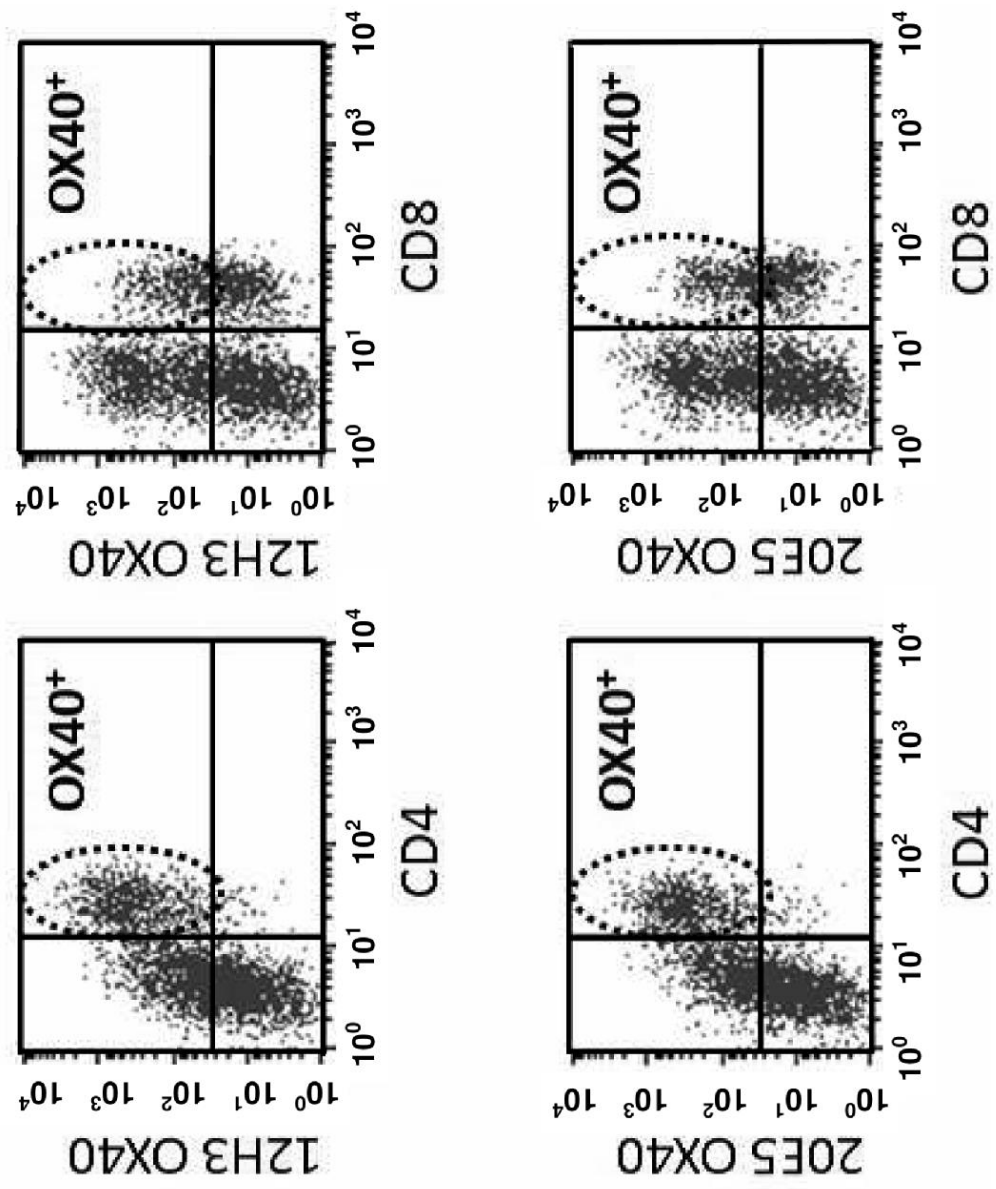


Figura 4

Figura 5

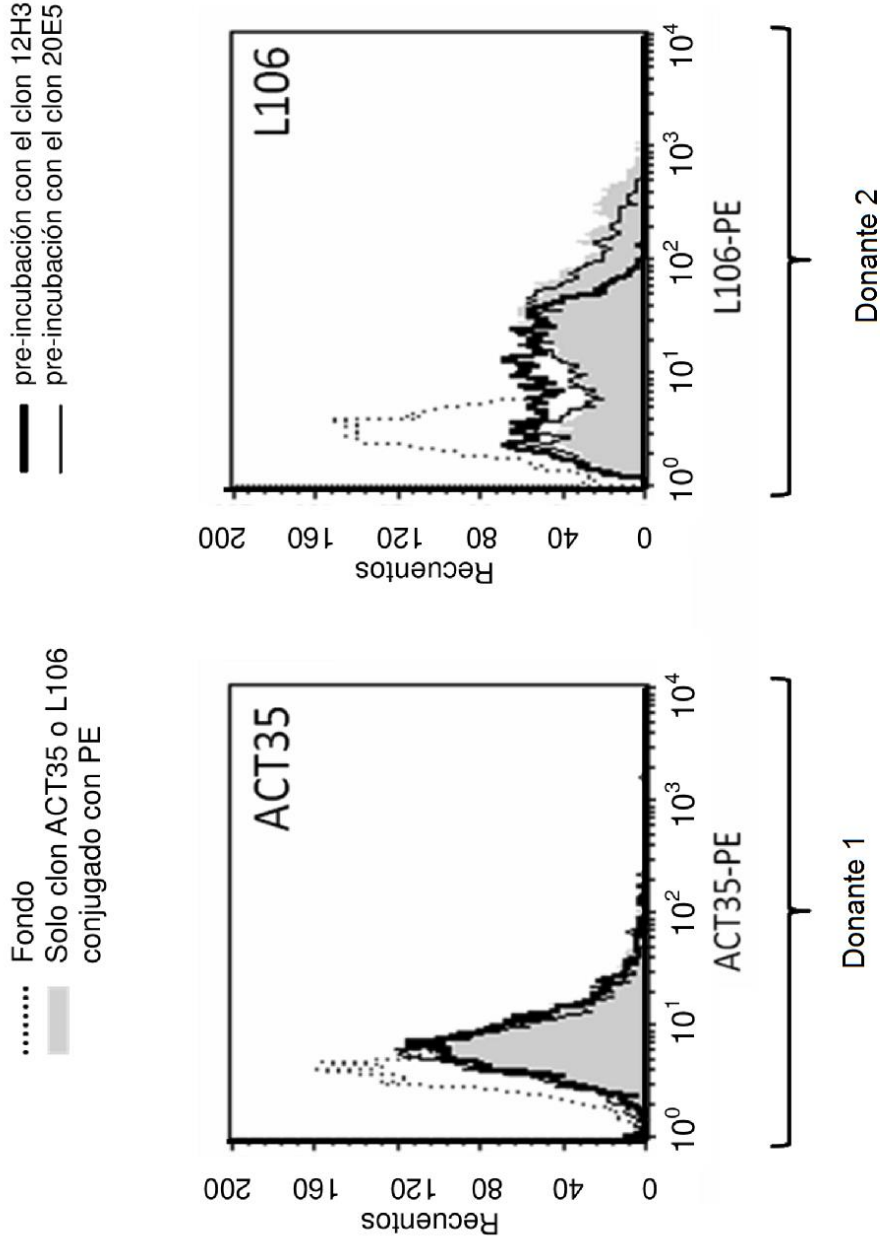


Figura 6

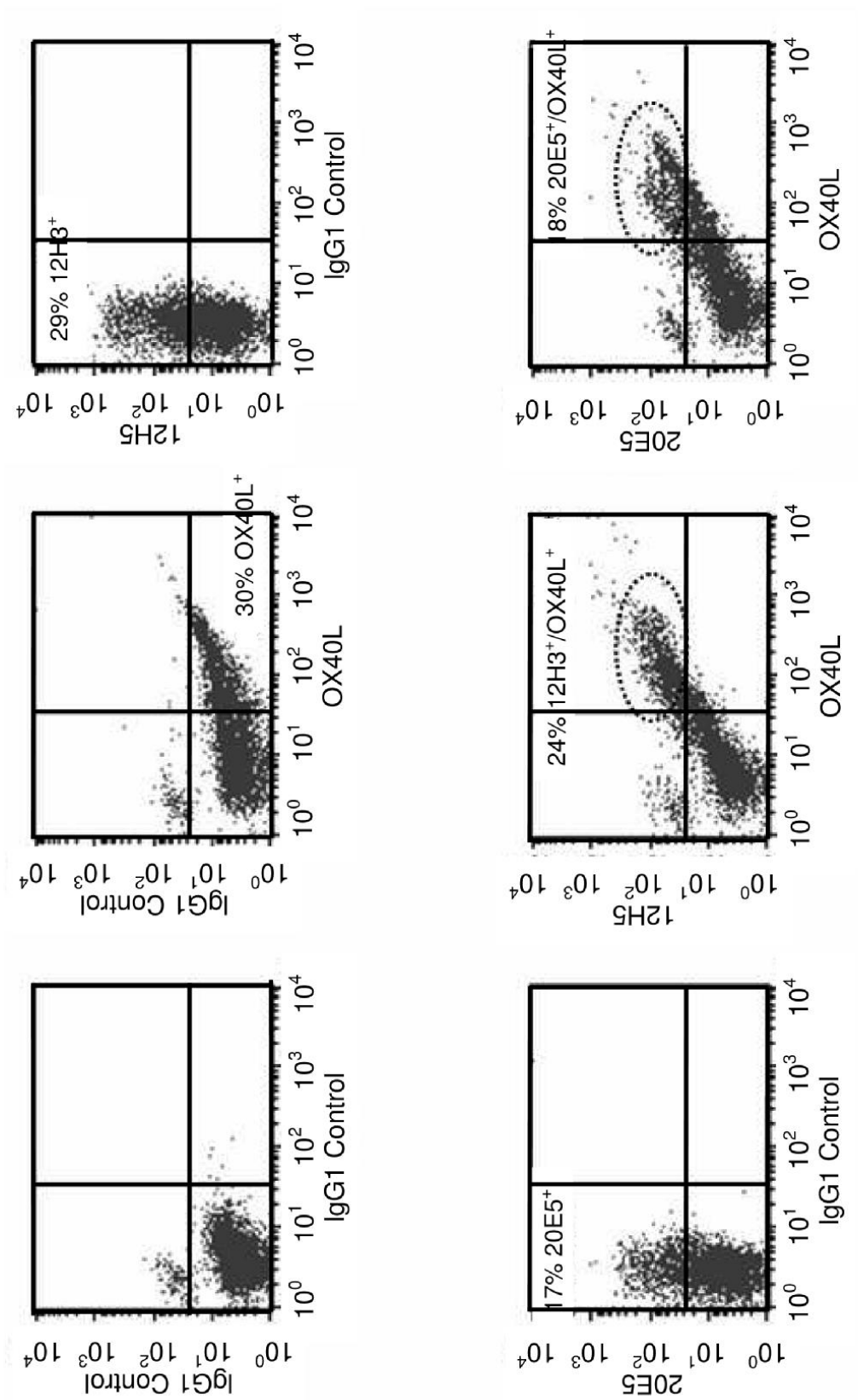


Figura 7

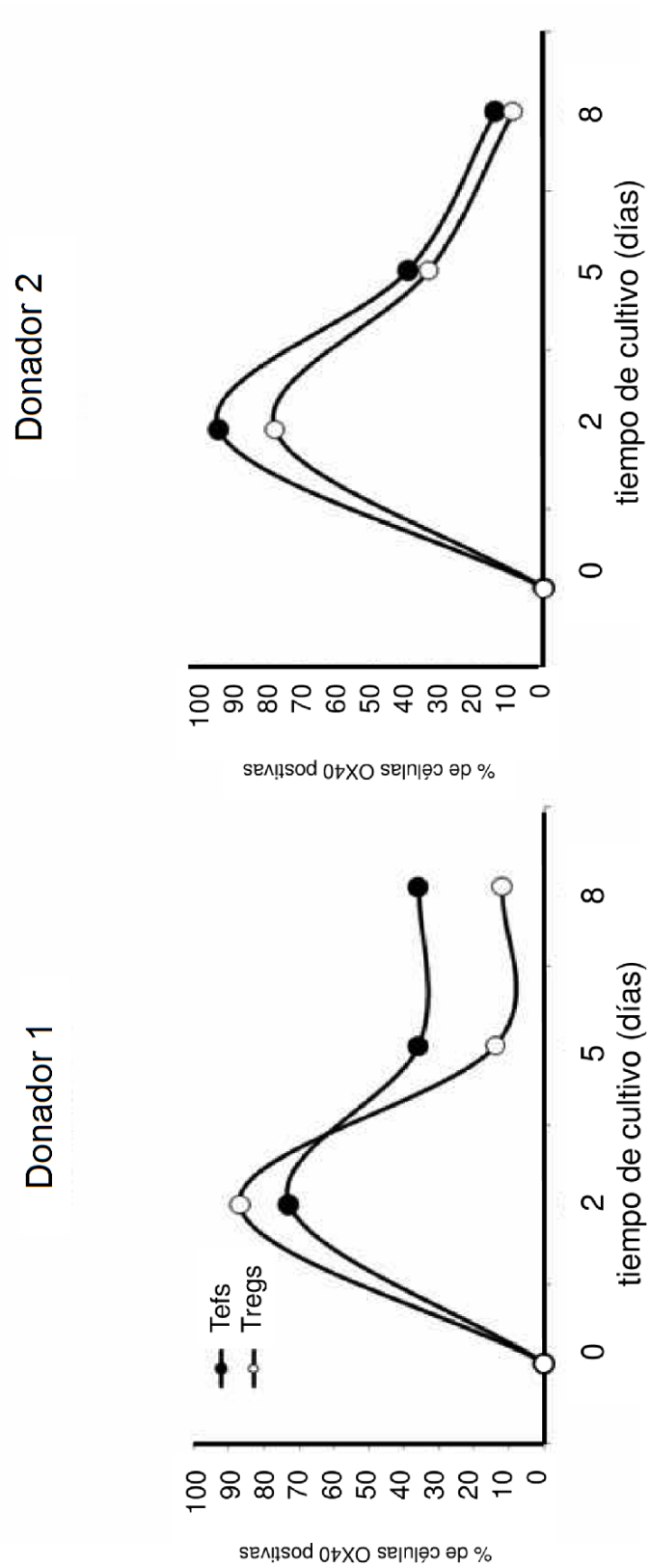


Figura 8

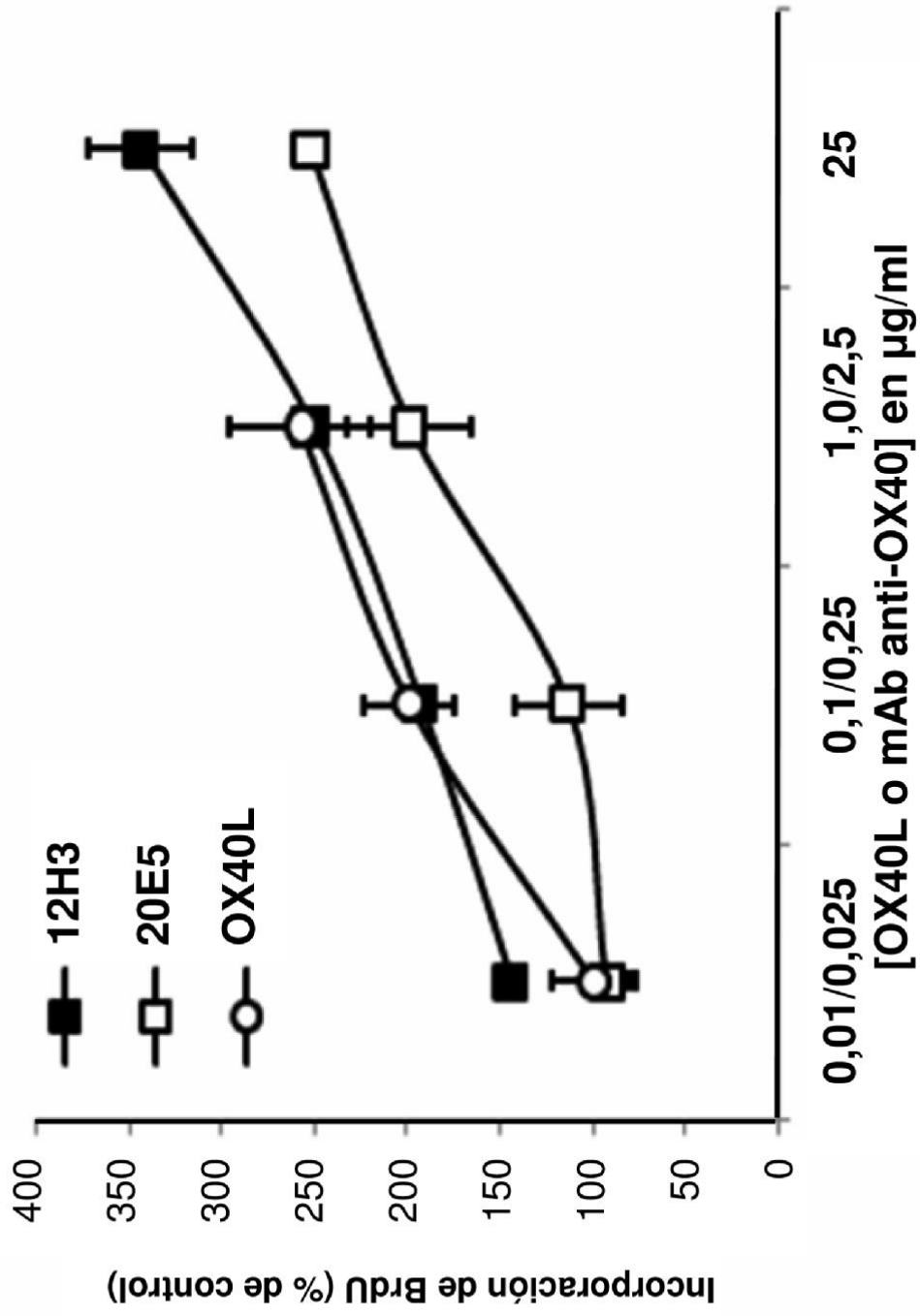


Figura 9

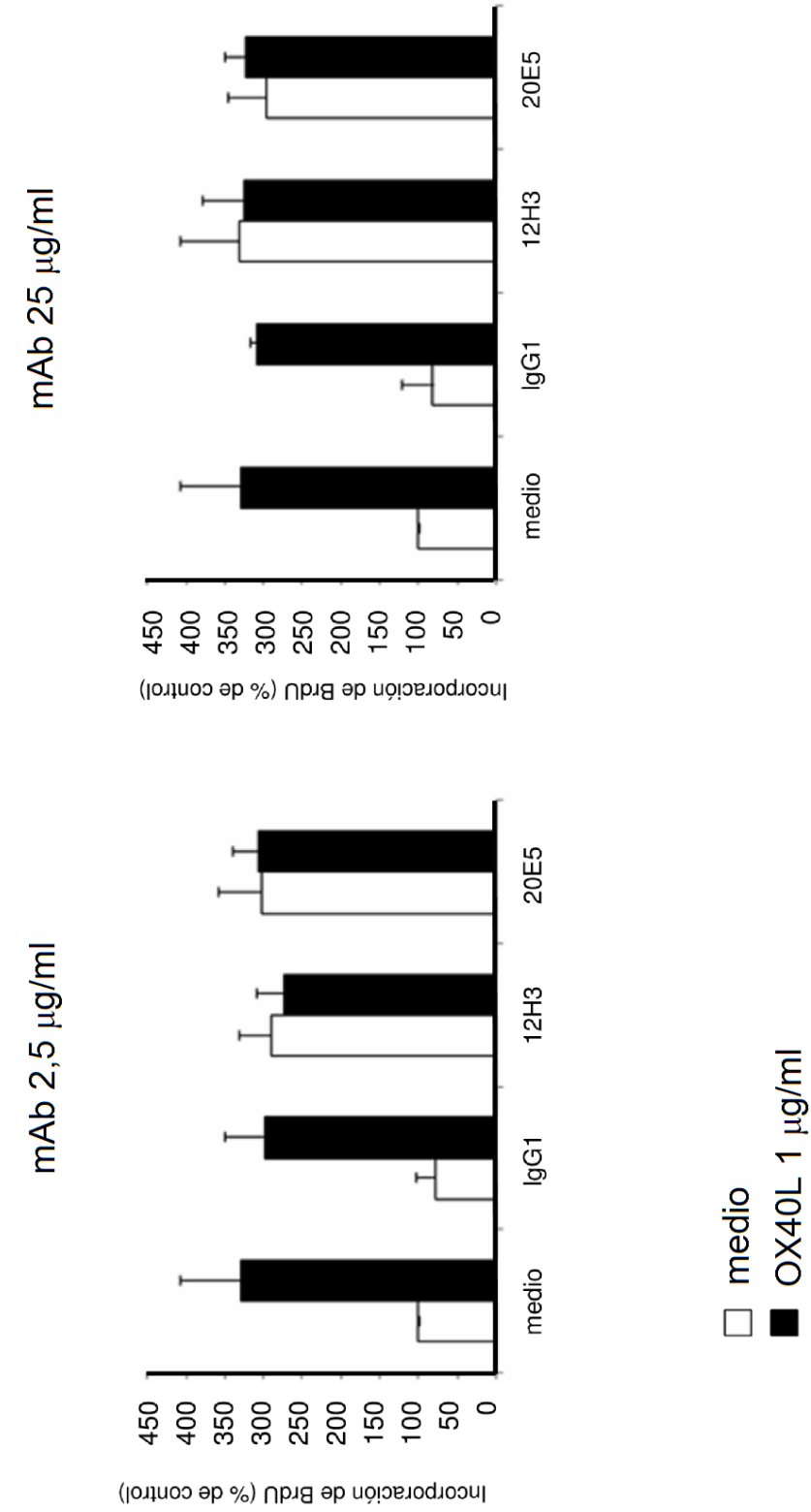


Figura 10

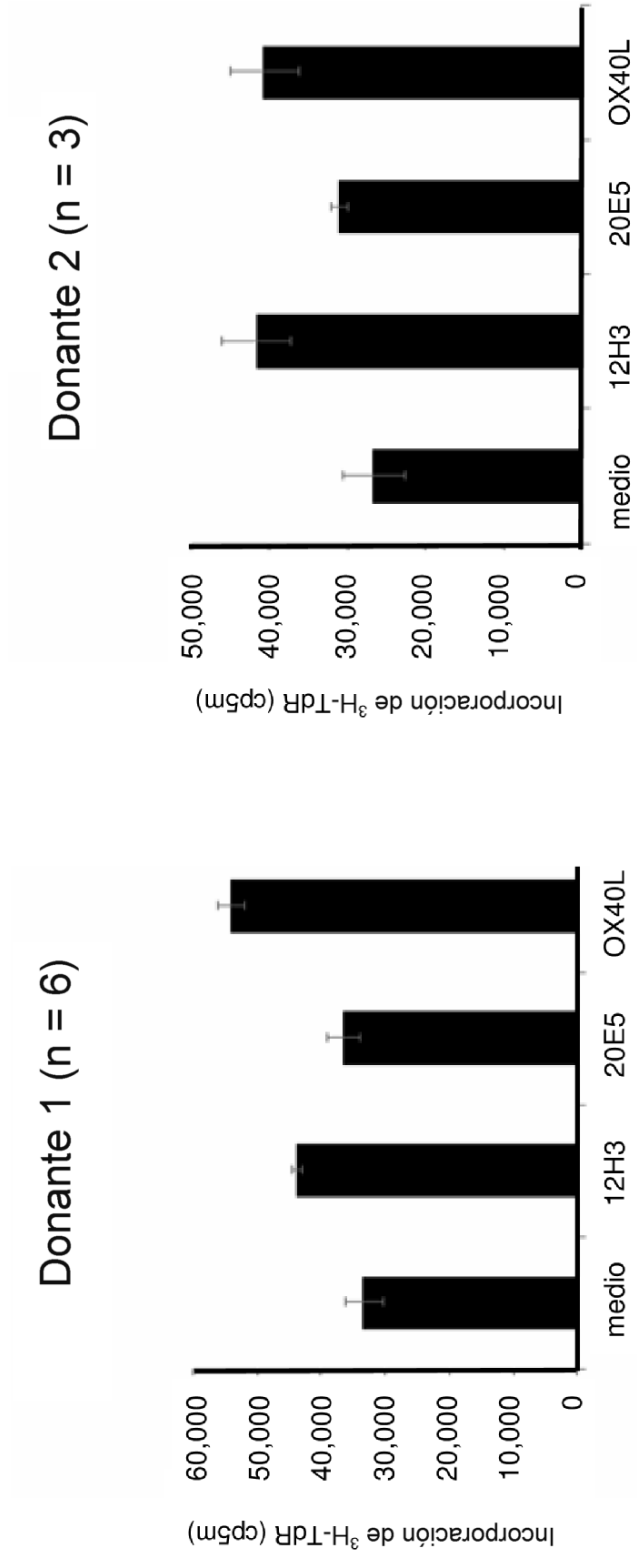
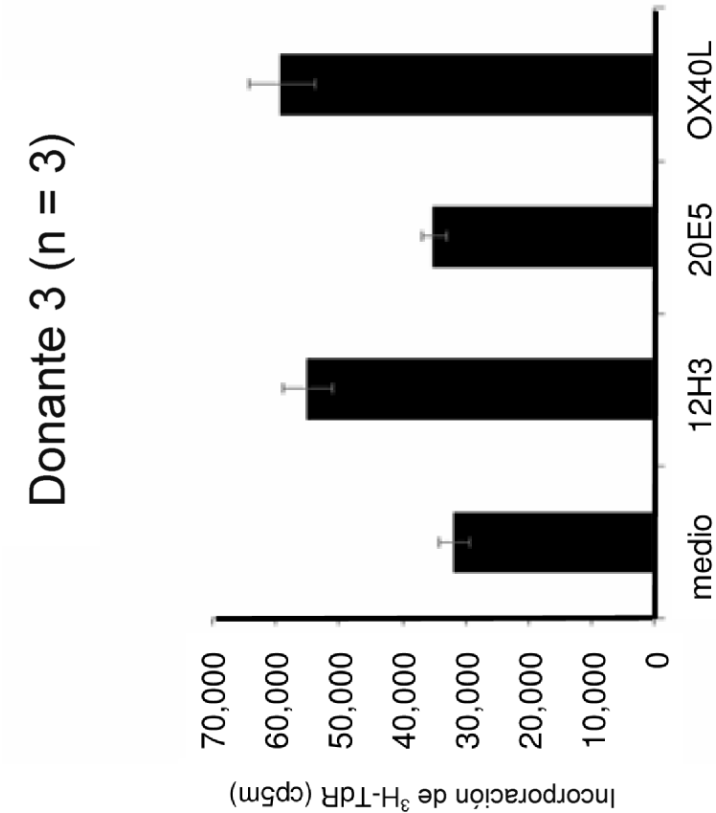


Figura 10 (cont.)



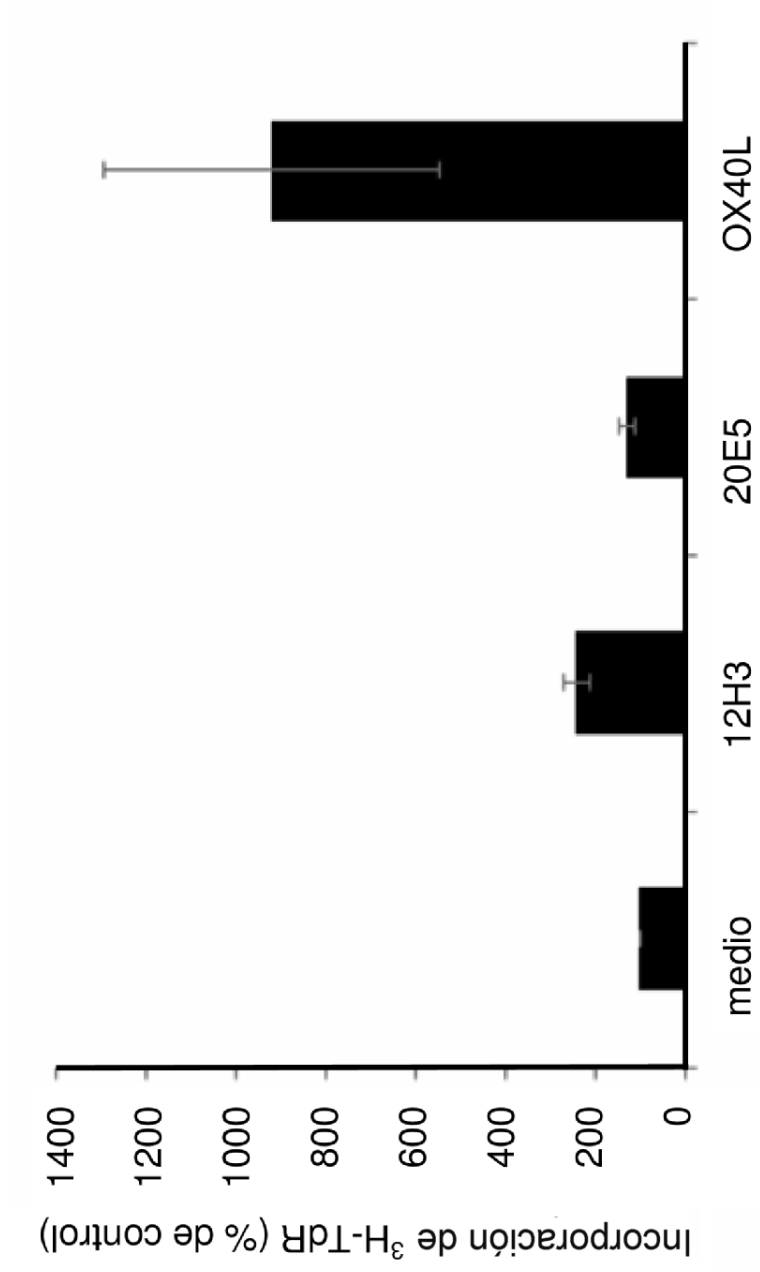


Figura 11

Figura 12

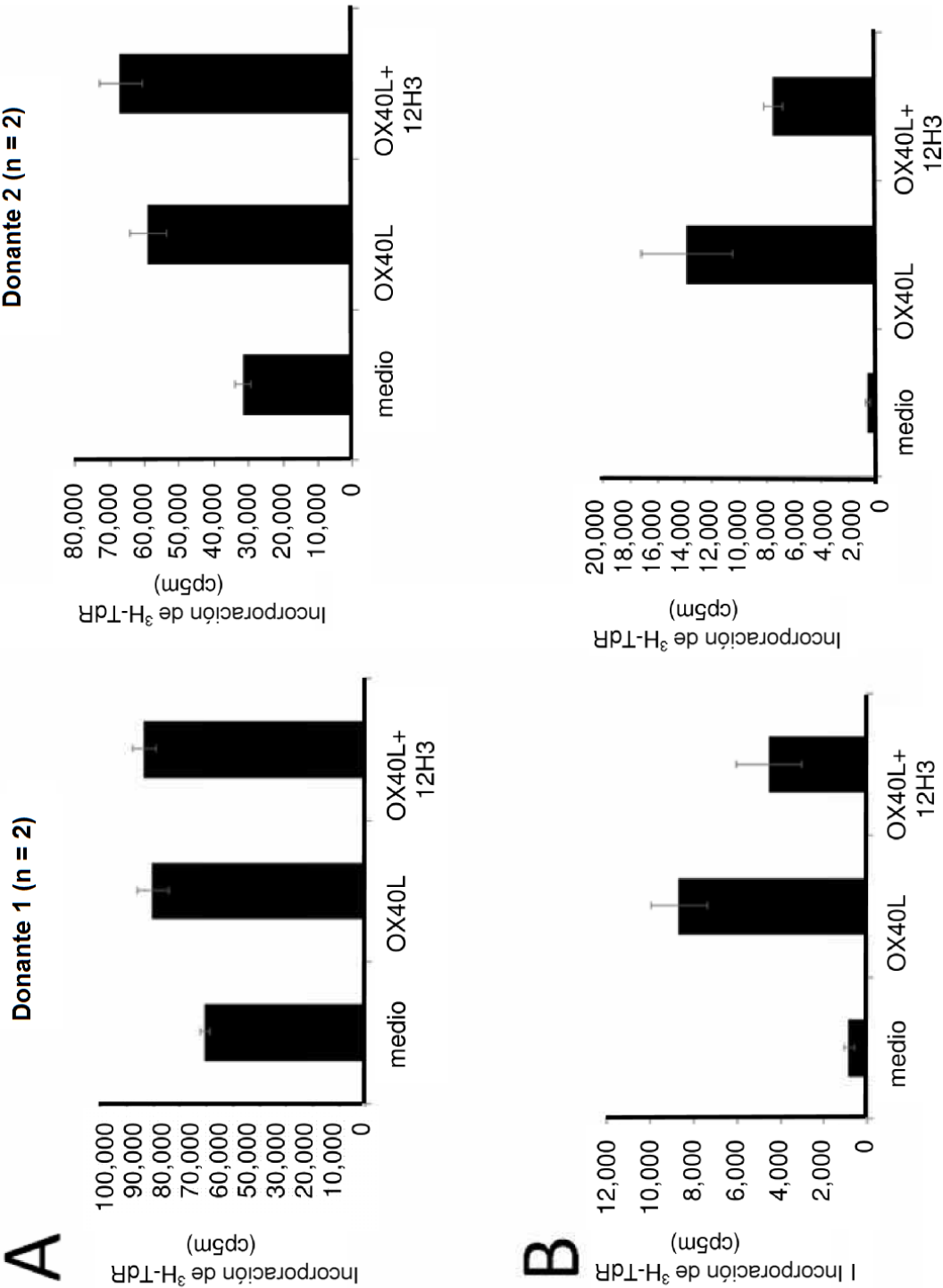


Figura 13

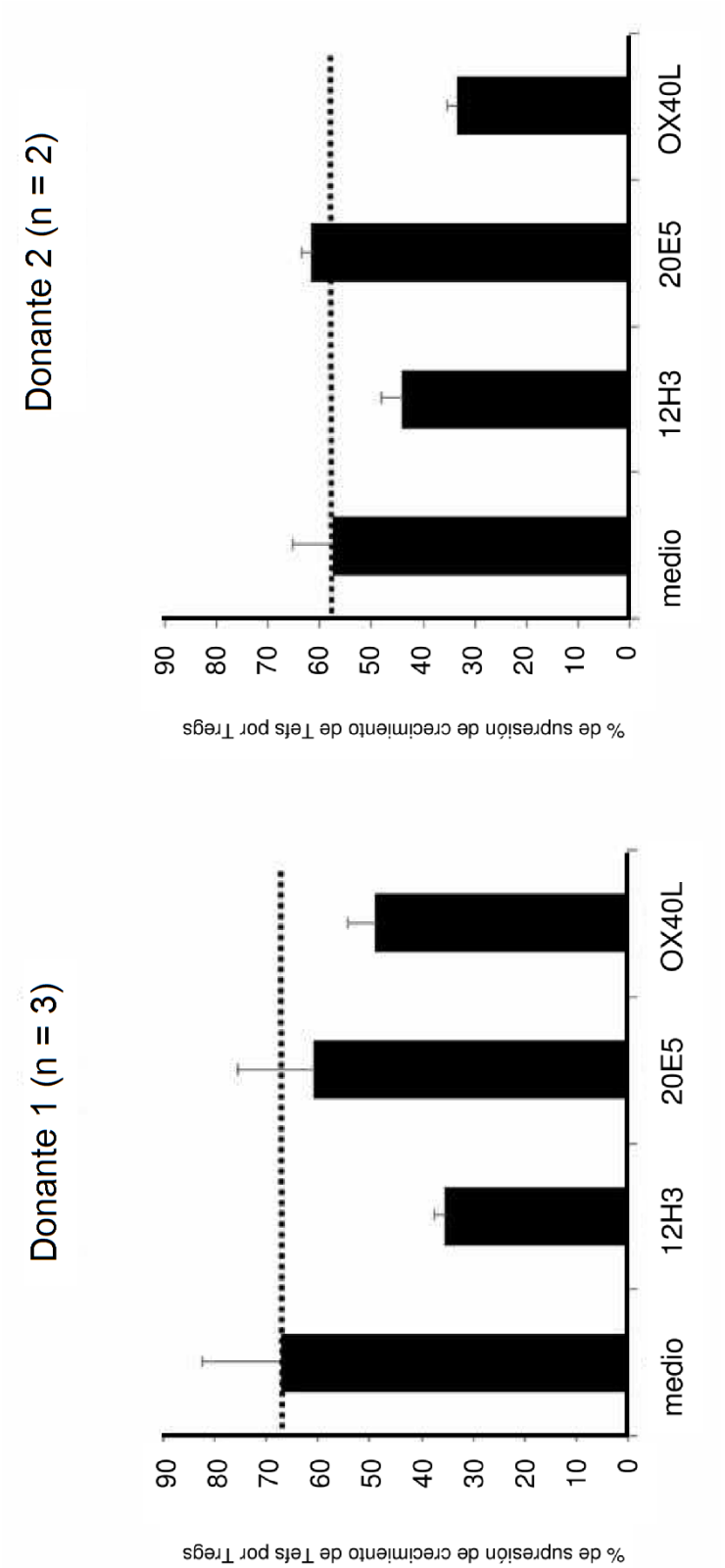


Figura 14

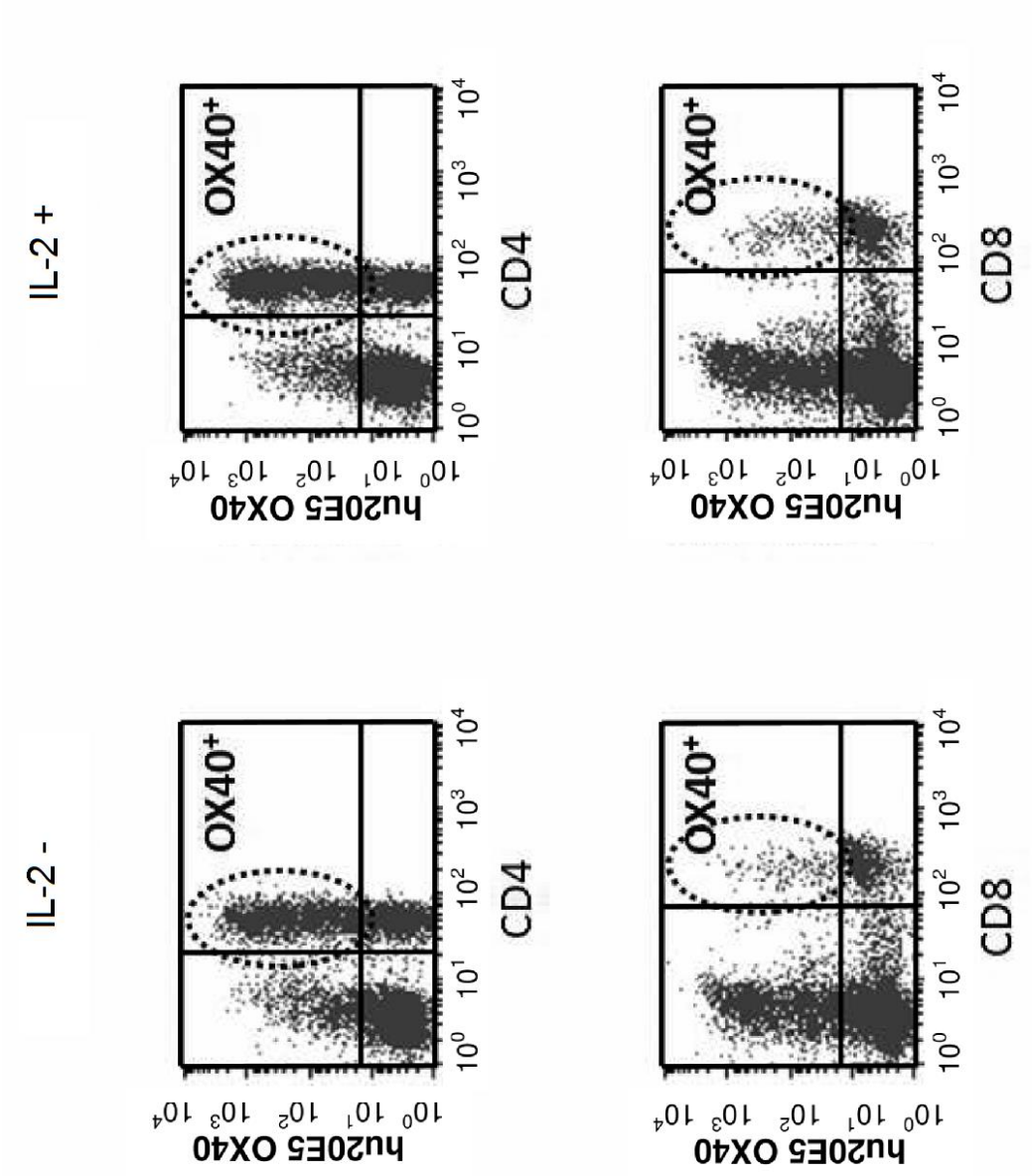


Figura 15

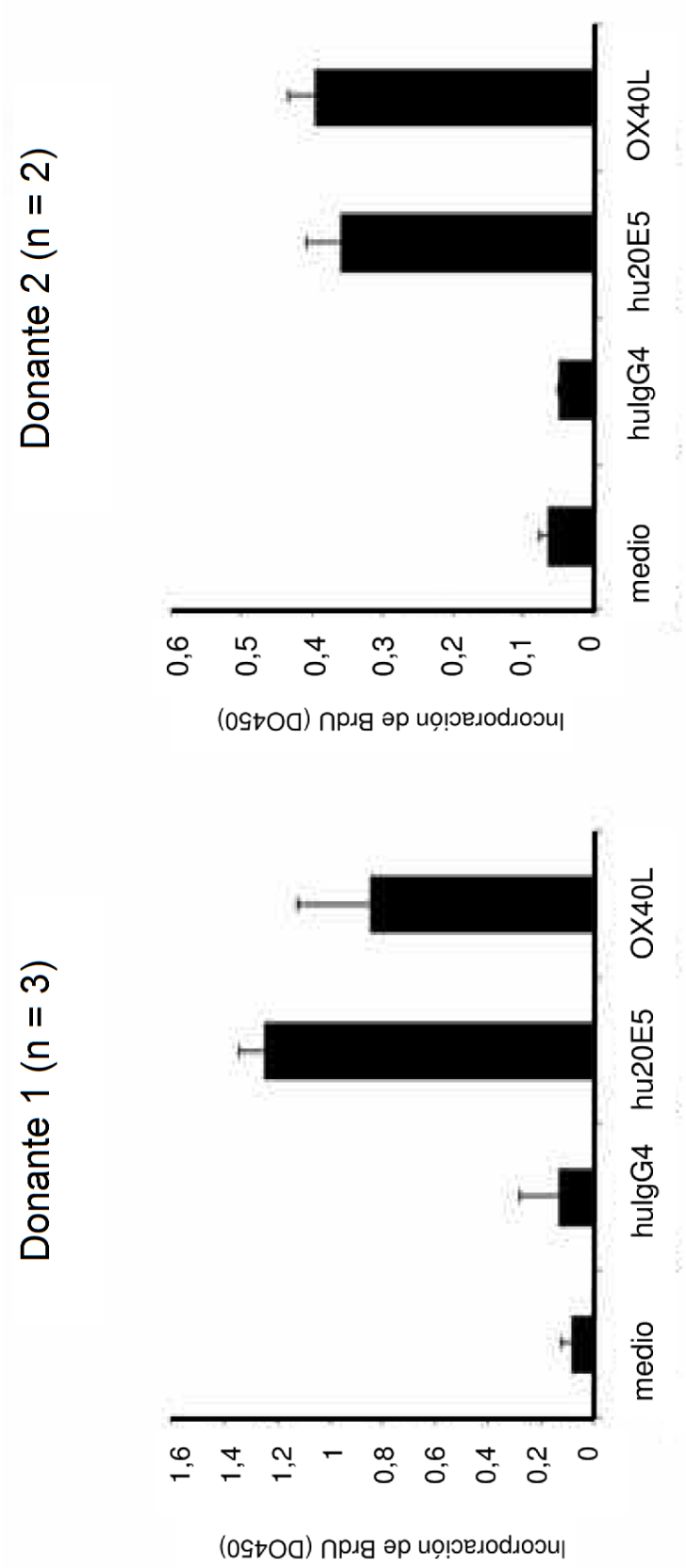


Figura 15 (cont.)

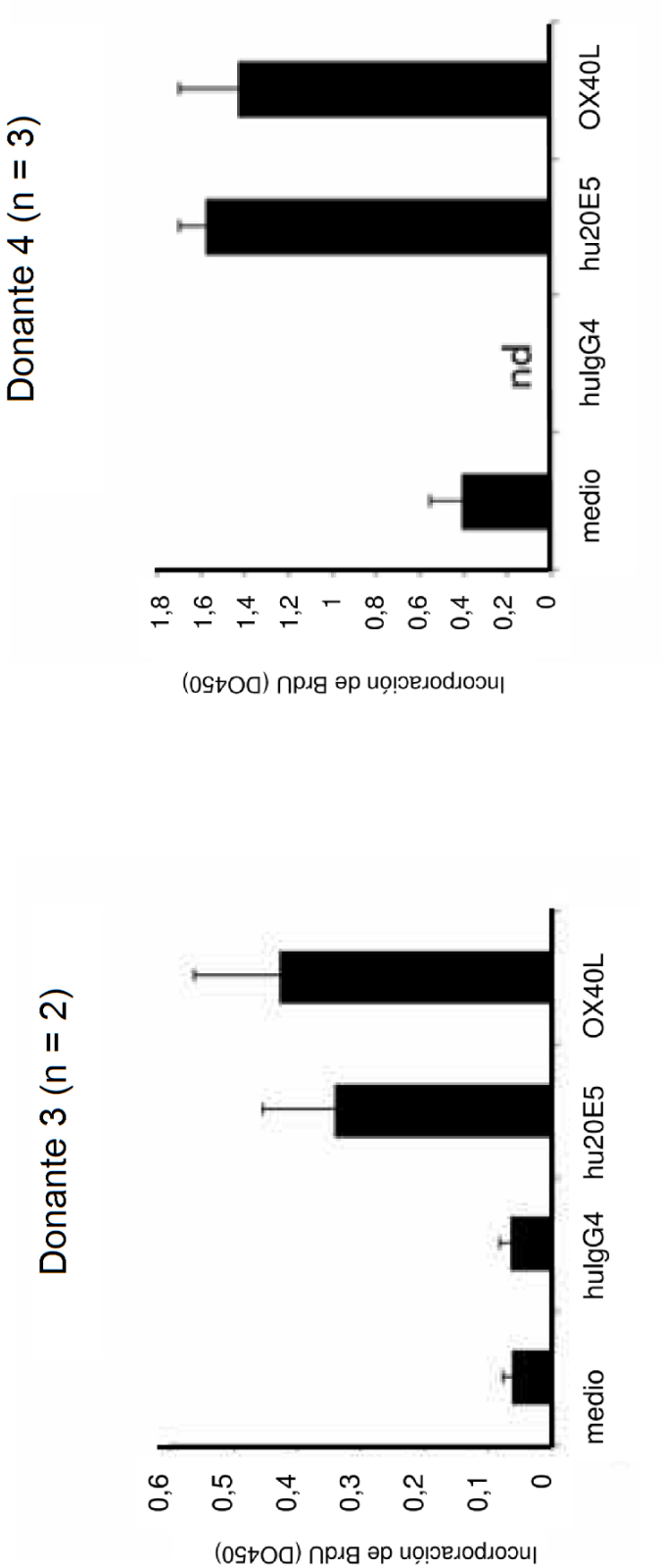


Figura 15 (cont.)

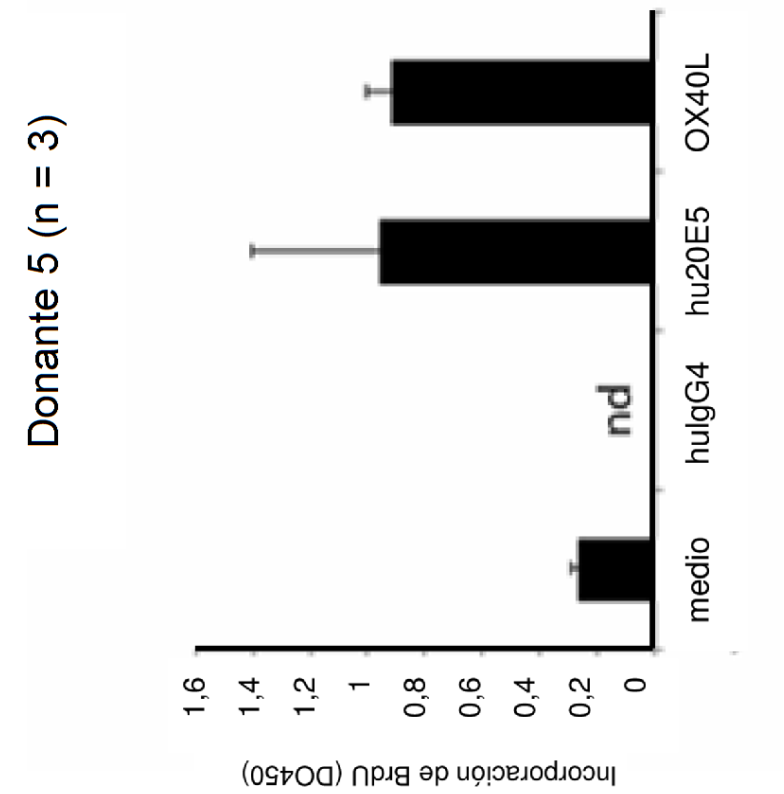
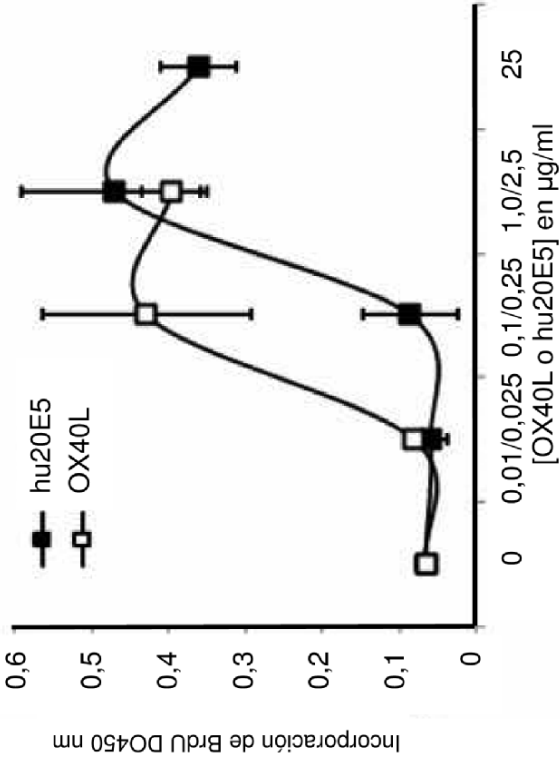


Figura 16

Donante 1 (n = 2)



Donante 2 (n = 2)

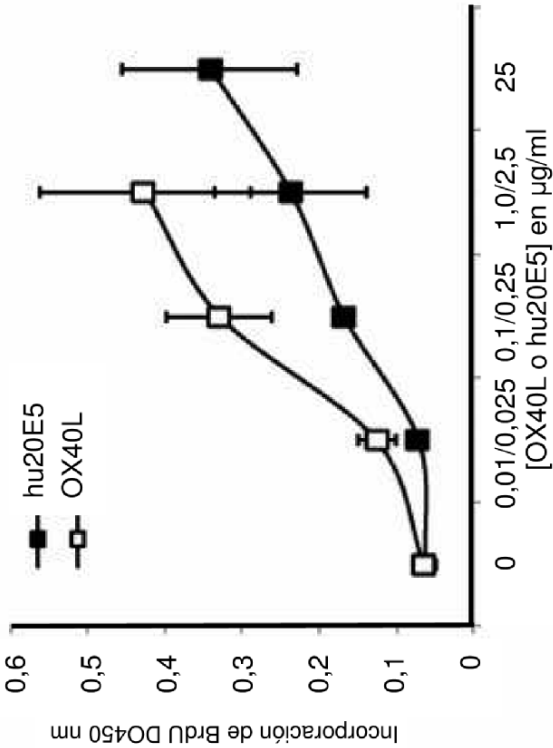
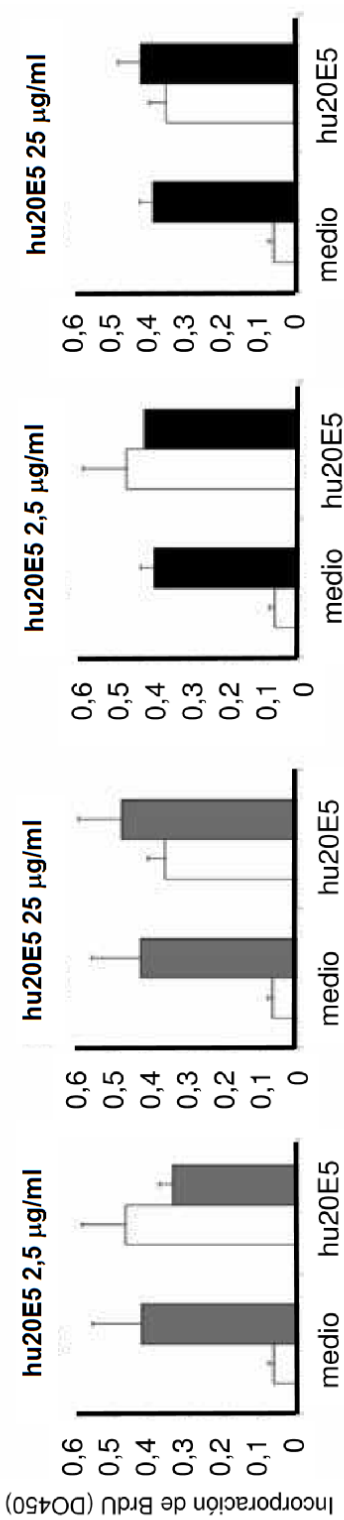


Figura 17

Donante 1 (n = 2)



Donante 2 (n = 2)

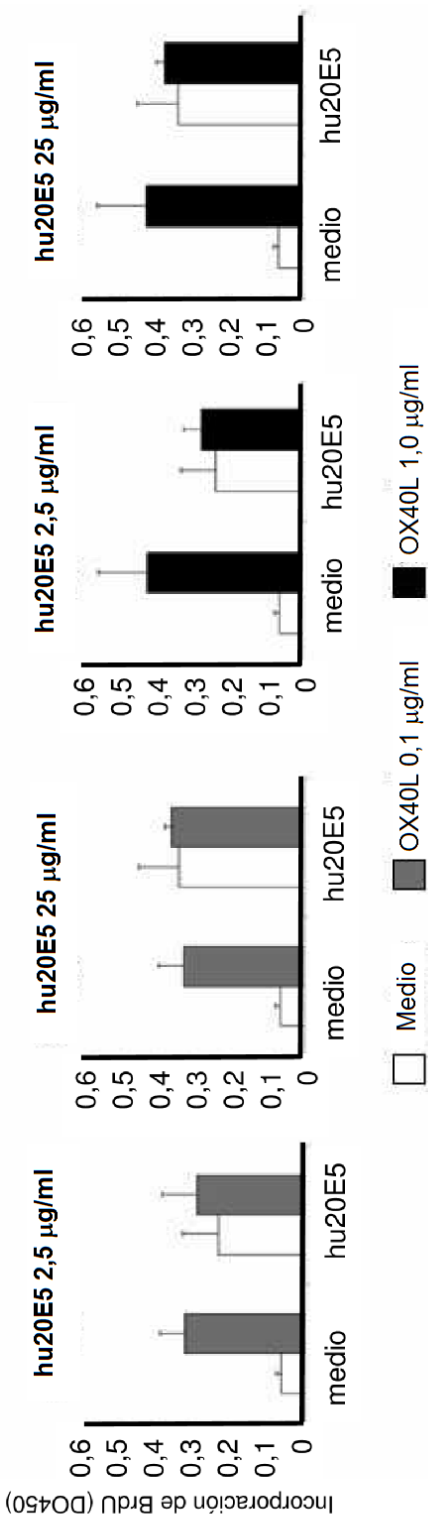


Figura 18

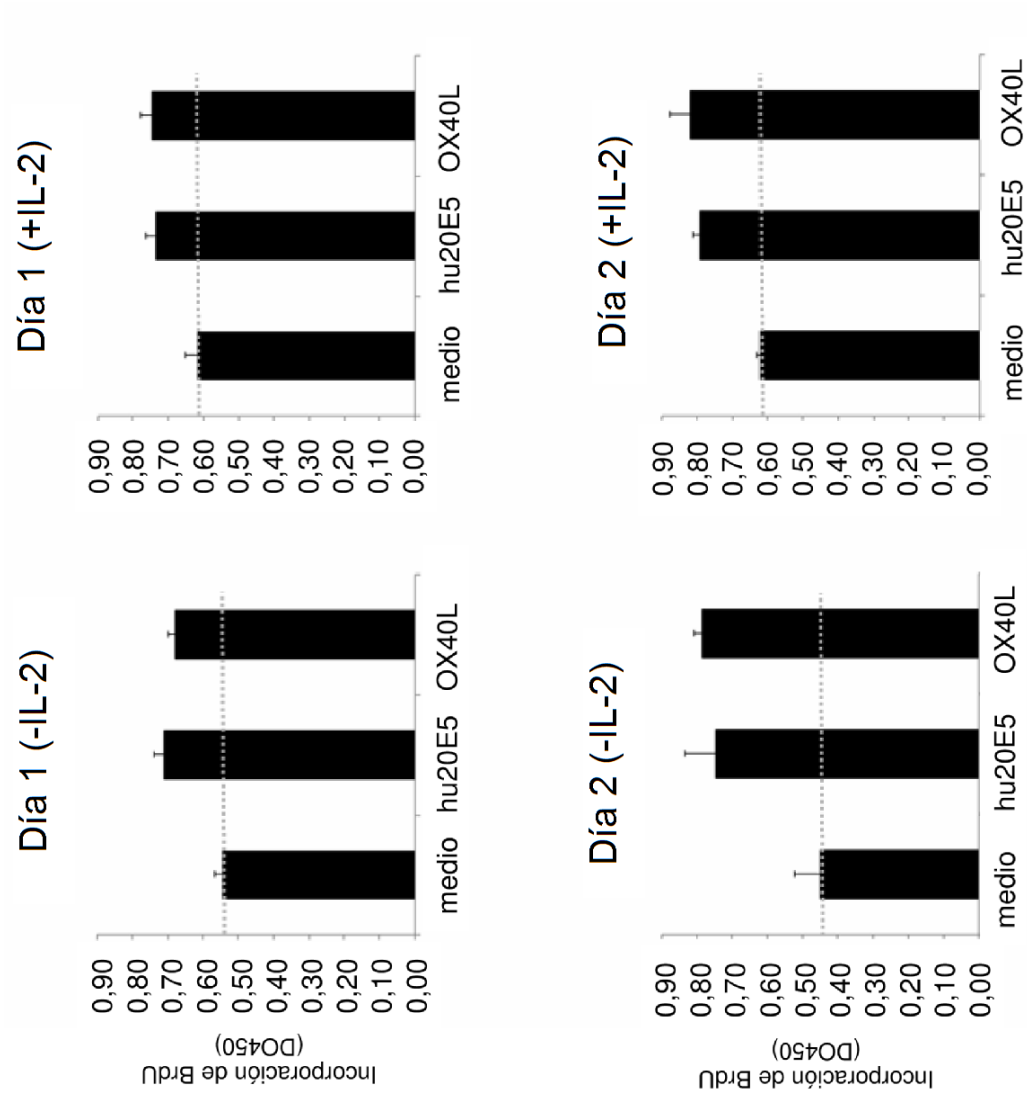


Figura 19

A

	reducción	Calentamiento 70 °C
a	-	-
b	-	+
c	+	-
d	+	+

B

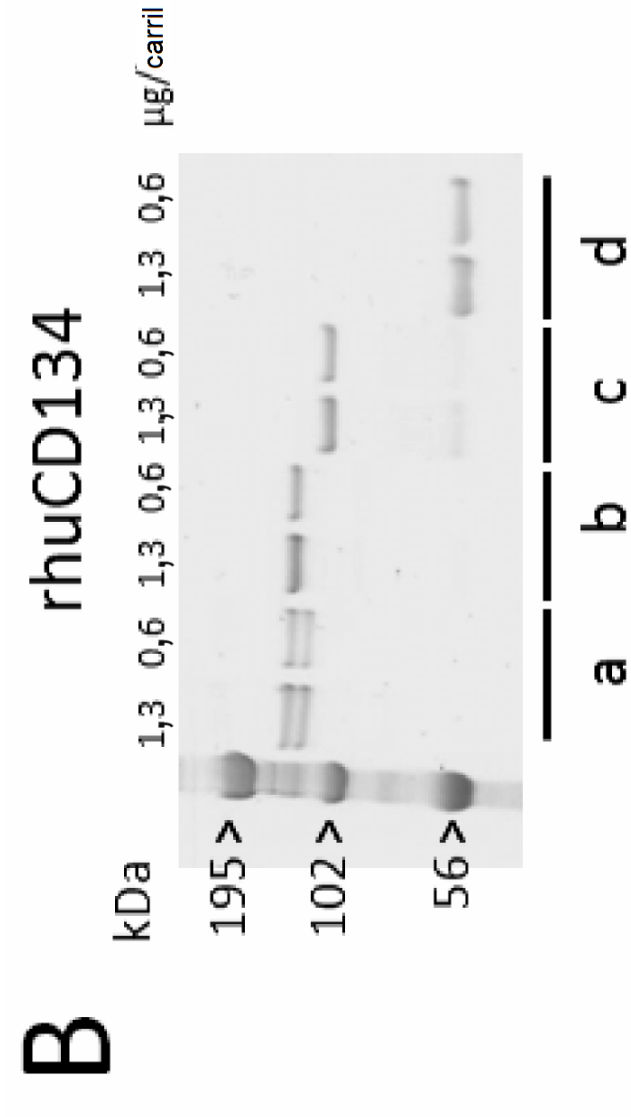


Figura 19 (cont.)

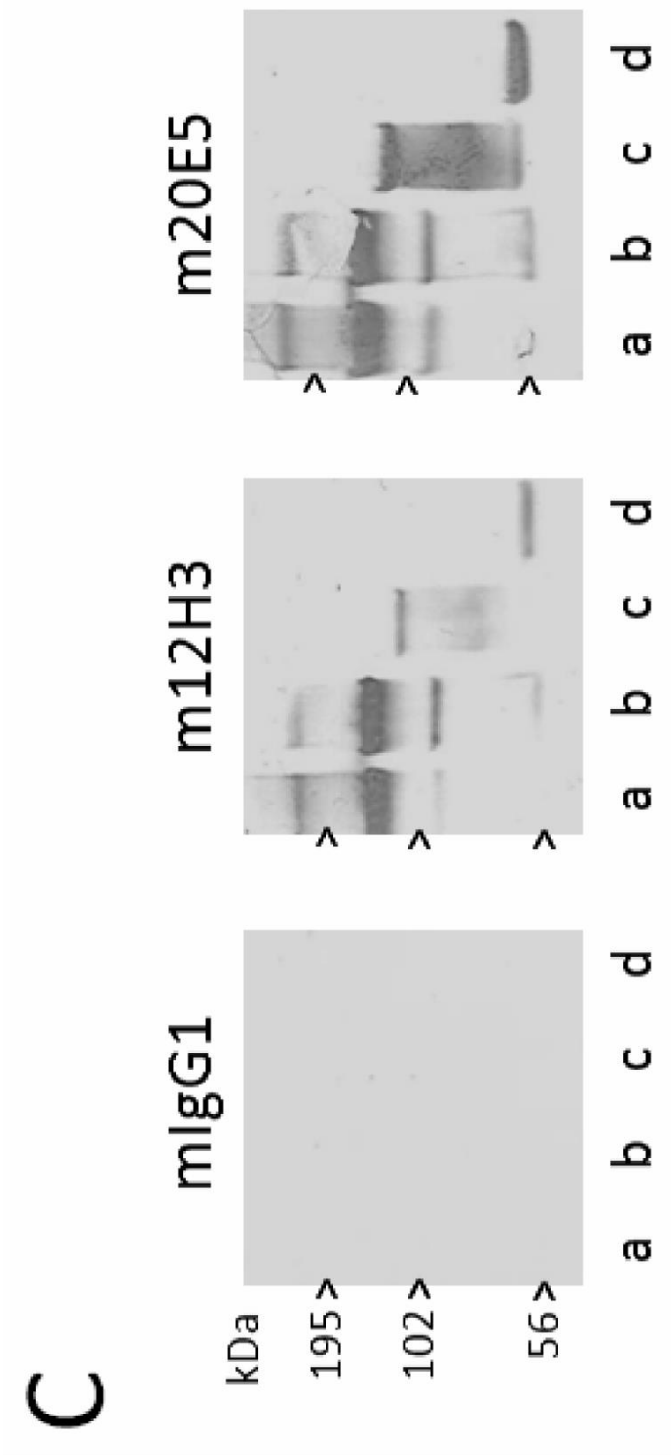
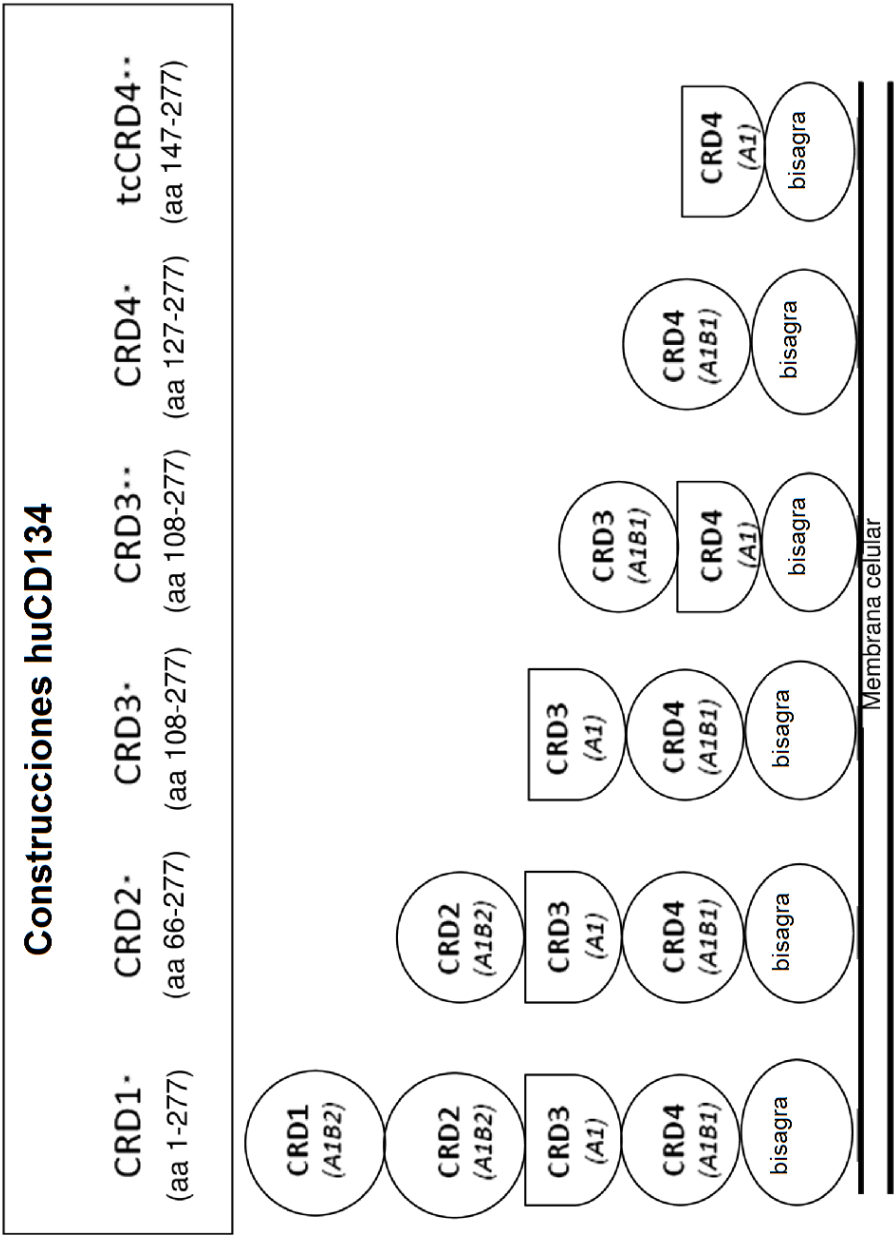


Figura 20



* Según Latza *et al.* Eur J. Immunol. 1994
**Según Compaan *et al.* Structure 2006

Figura 21

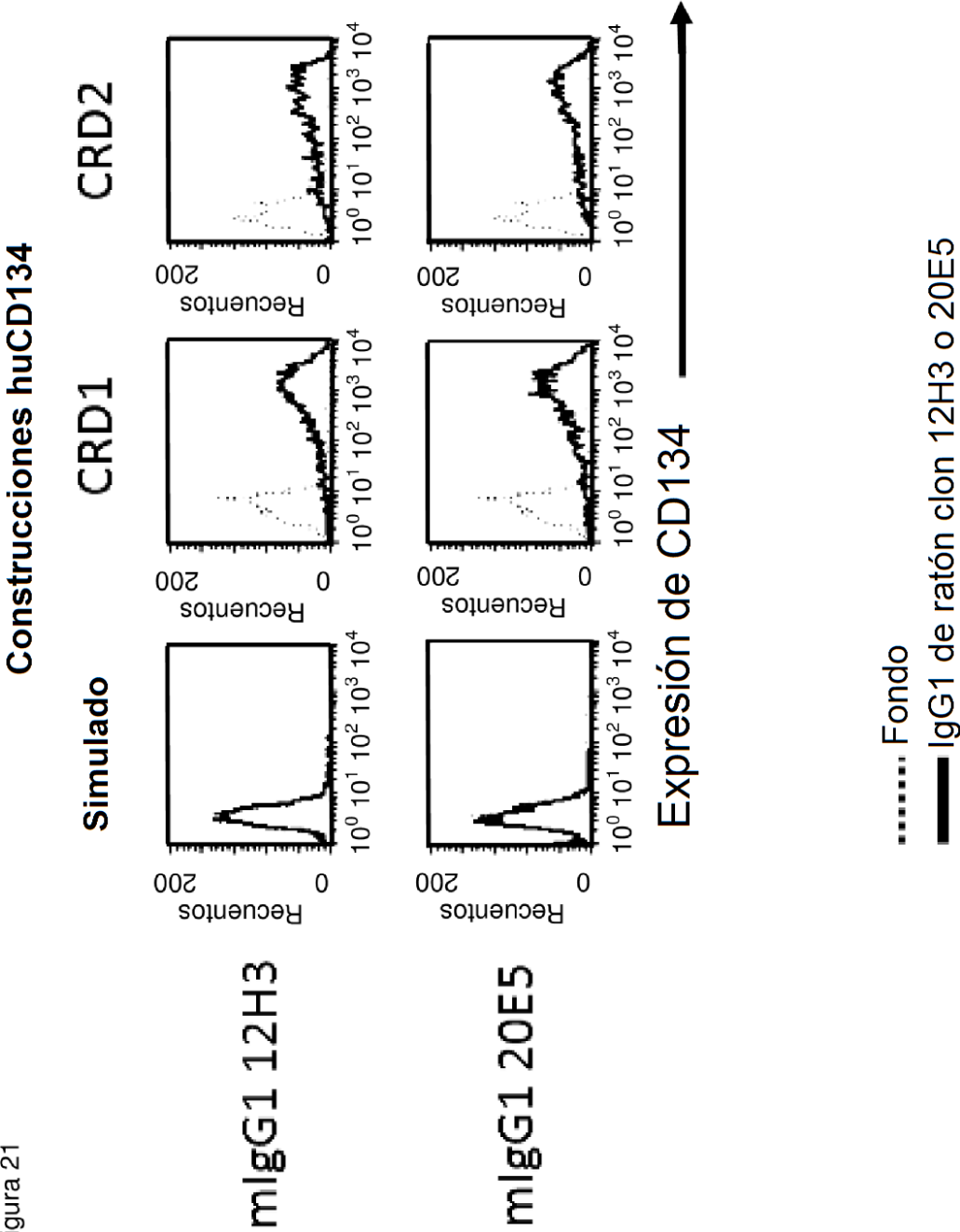


Figura 21 (cont.)

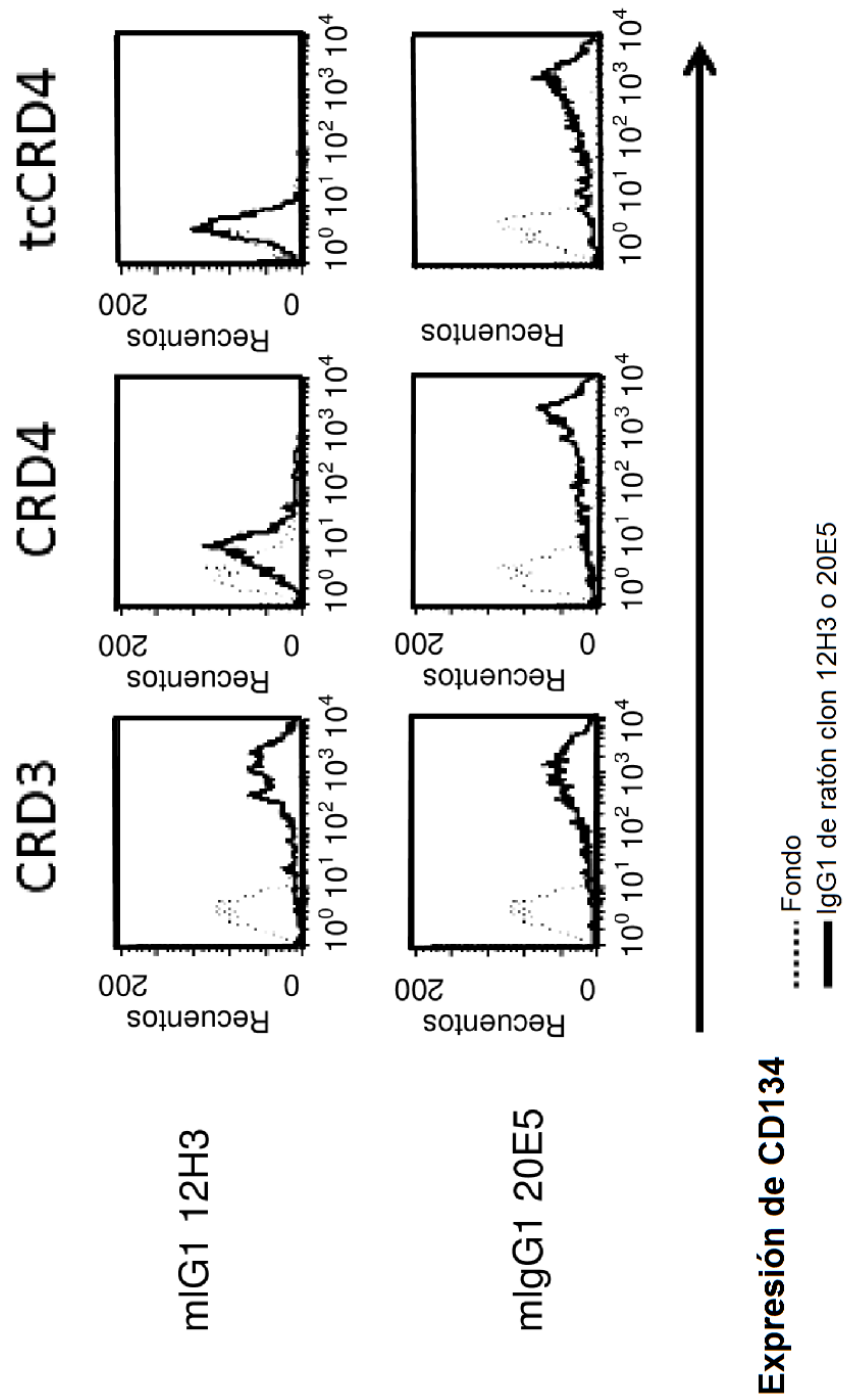


Figura 22

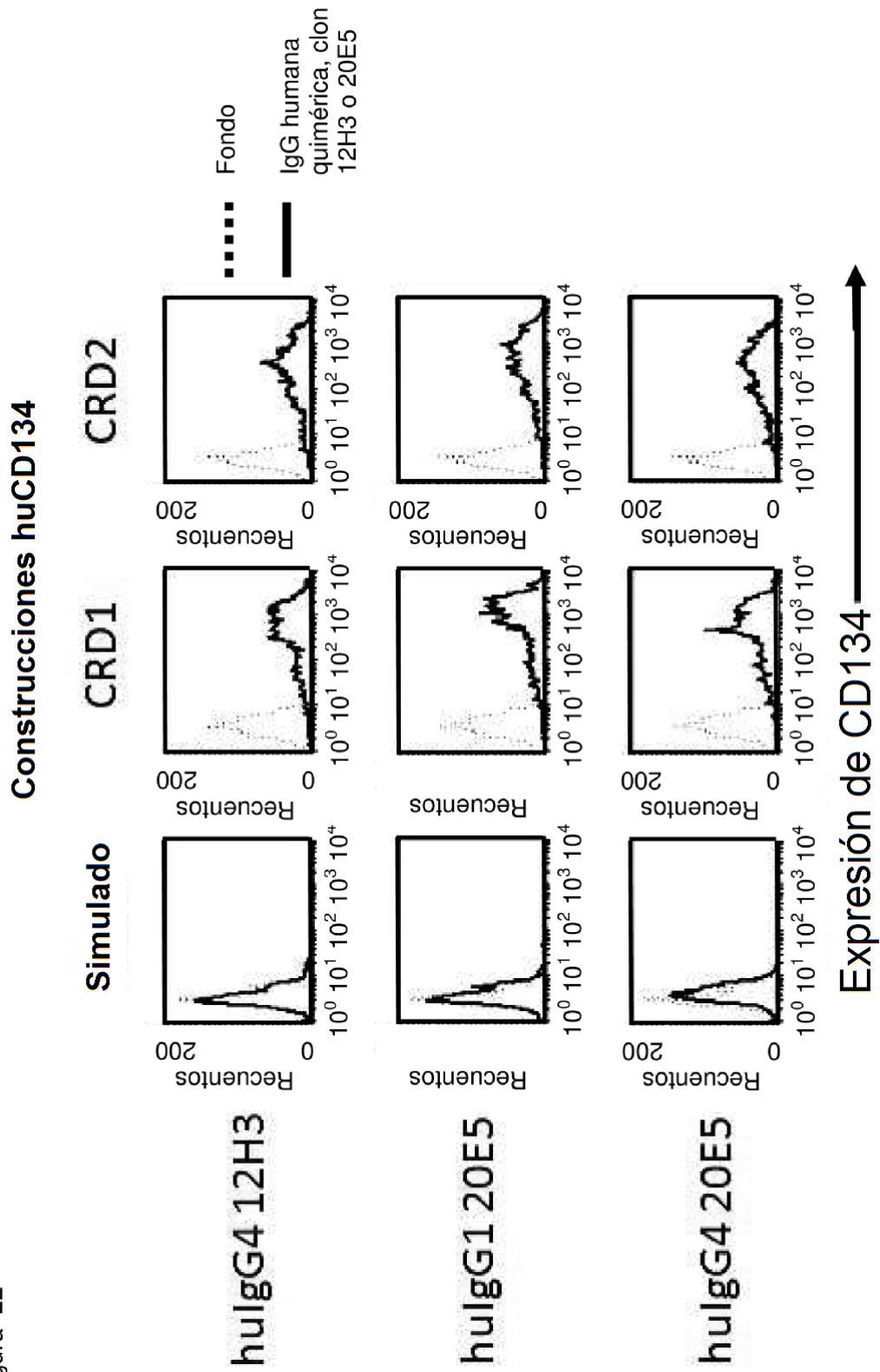


Figura 22 (cont.)

Construcciones huCD134

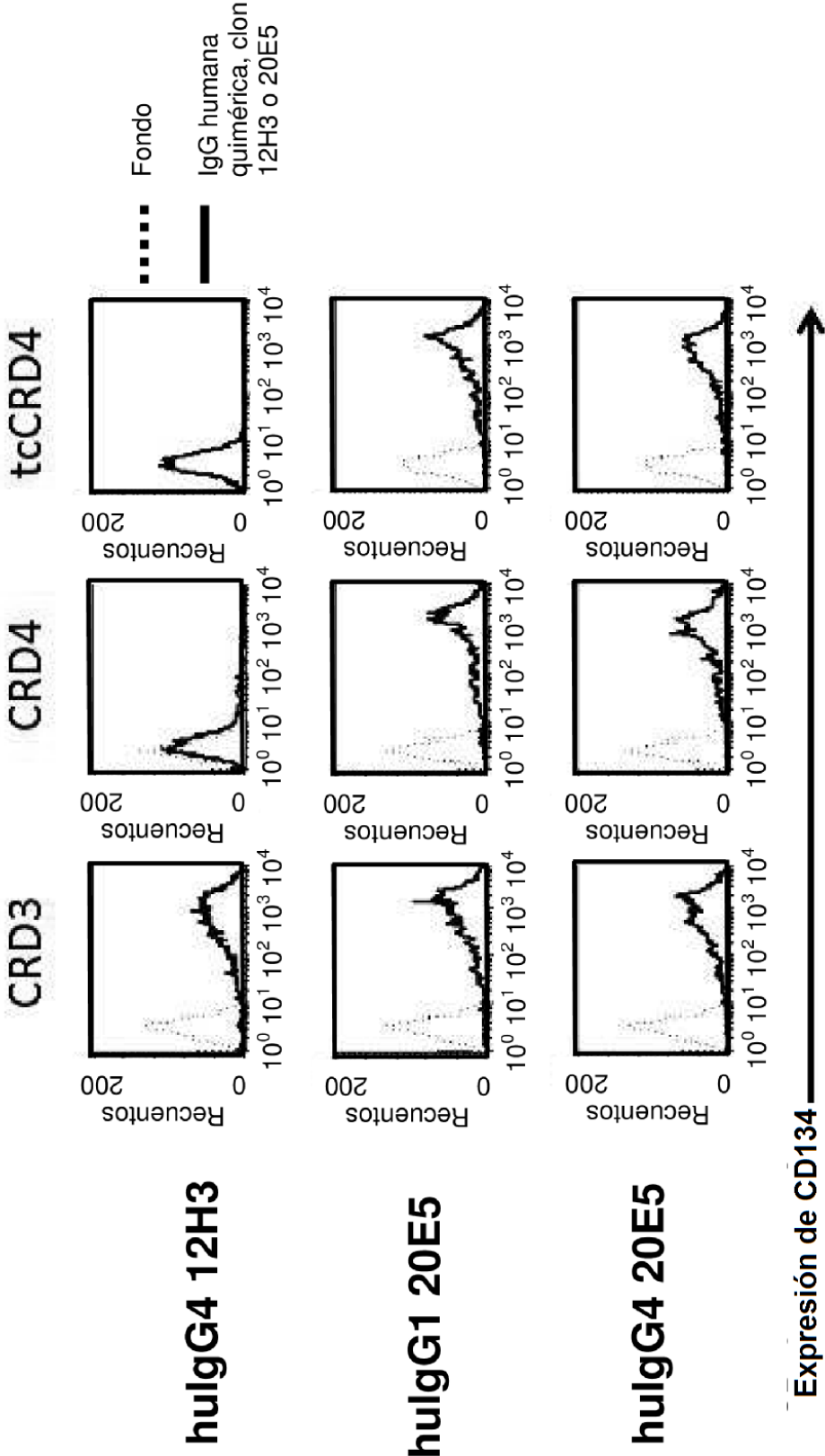


Figura 23

A

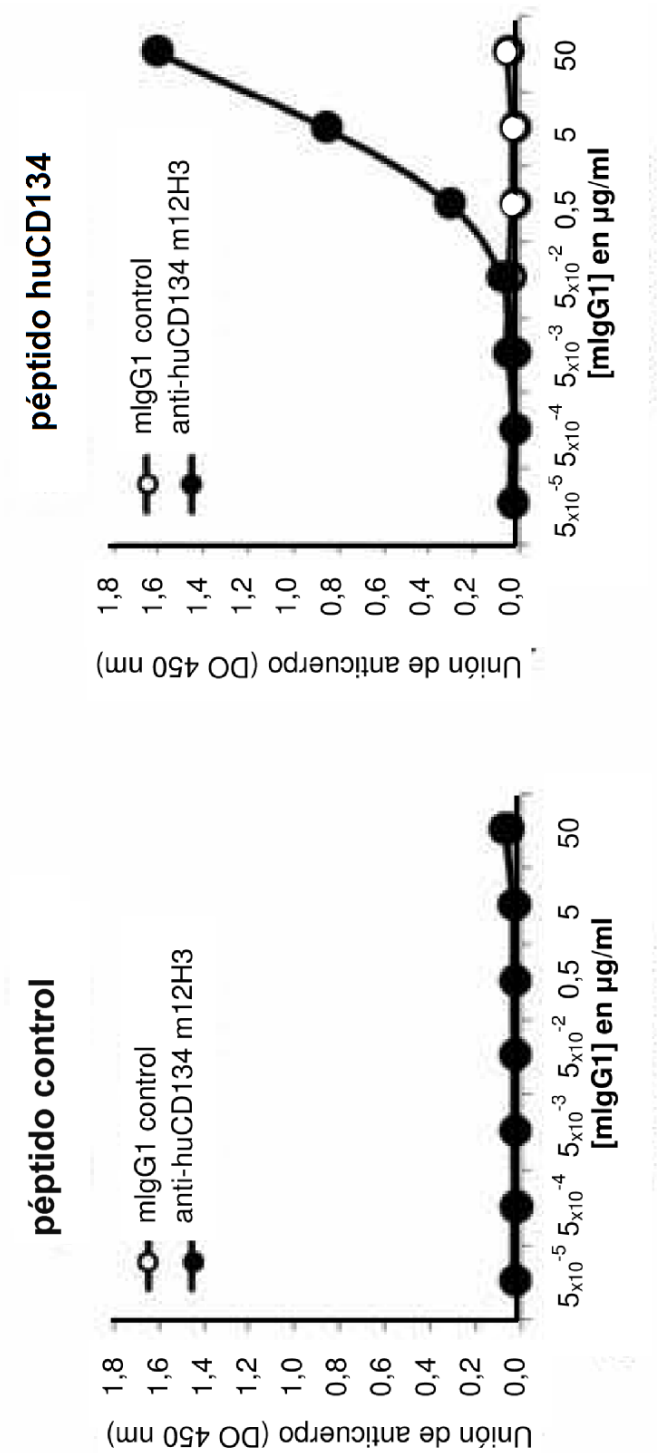


Figura 23 (cont.)

B

