

ANTICUERPOS CONTRA EL RECEPTOR DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL INDUCIDO POR GLUCOCORTICOIDES (GITR) Y SUS USOS

REFERENCIA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica prioridad de las solicitudes provisionales estadounidenses N.º 62/008.945 y 62/082.980, titulada "Anticuerpos contra el receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (GITR) y sus usos", presentada el 6 de junio de 2014 y 21 de noviembre de 2014, respectivamente, cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia.

ANTECEDENTES

La proteína relacionada con TNFR inducido por glucocorticoides (GITR), una molécula coestimuladora también conocida como TNFRSF18, AITR, CD357 y GITR-D, es un miembro de la familia del receptor de TNF identificado originalmente en líneas de linfocitos T murinos tratados con dexametasona (Nocentini *et al.*, *PNAS* 1997;94:6216-21). Otros miembros relacionados de la familia del receptor de TNF incluyen CD40, CD27, 4-1BB y OX40. A pesar de que la expresión de GITR es baja en linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ sin tratamiento previo, se expresa constitutivamente en linfocitos T reguladores (Tone *et al.*, *PNAS* 2003;100:15059-64). Sin embargo, una vez que la expresión se induce en los linfocitos T efectores, el acoplamiento de GITR promueve su activación, proliferación y producción de citocina (Watts, *Annual Reviews in Immunology* 2005;23:23-68). Con respecto a los linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺ (Tregs), Shimizu informó que el acoplamiento de GITR suprime su función (Shimizu *et al.*, *Nature Immunology* 2002;3:135-42), usando un ensayo de supresión de cultivos mixtos. Sin embargo, el posterior trabajo de Stephans *et al* (*Jl* 2004 15;173(8):5008-20) determinó que el acoplamiento de GITR a los linfocitos T efectores (T_{eff}) los vuelve menos sensibles a la supresión de Treg, lo que representa la supresión reducida observada en cocultivos de linfocitos Treg-T_{eff}. La estimulación de GITR mediado por el anticuerpo DTA-1 (GITR anti-ratón de rata) promueve inmunidad antitumoral en diversos modelos de tumores.

GITR-L, el ligando para GITR, se expresa en niveles bajos en células que presentan antígenos (por ejemplo, linfocitos B, células dendríticas), pero se regula en forma ascendente de manera transitoria en estas células después de la activación, por ejemplo, mediante infección viral (Suvas *et al.*, *J Virol.* 2005;79:11935-42).

Debido a la necesidad constante de estrategias mejoradas para combatir

enfermedades, tales como cáncer, los beneficios de las respuestas inmunitarias mejoradas, en particular, respuestas de linfocitos T, los agentes novedosos y los métodos que modulan la actividad de GITR son altamente convenientes.

SÍNTESIS

Se proporcionan en la presente anticuerpos aislados, tales como anticuerpos monoclonales, en particular, anticuerpos monoclonales humanos, que se fijan específicamente a GITR y tienen propiedades funcionales convenientes. Estas propiedades incluyen alta afinidad de fijación a GITR humano, fijación a GITR de mono (por ejemplo, GITR de *Macaca fascicularis*), y la capacidad de estimular respuestas de linfocitos T específicos del antígeno. Los anticuerpos descritos en la presente se pueden usar para estimular respuestas de linfocitos T específicos del antígeno, por ejemplo, en un sujeto con tumores o virus (infectado por virus), y para detectar la proteína GITR en una muestra.

En un aspecto, se proporcionan en la presente anticuerpos aislados, o las porciones de fijación al antígeno de estos, que se fijan a GITR y exhiben al menos una de las siguientes propiedades:

- (a) se fijan a GITR humano soluble;
- (b) se fijan a GITR humano unido a la membrana;
- (c) se fijan a GITR de *Macaca fascicularis* unido a la membrana;
- (d) inducen o mejoran la activación de linfocitos T, por ejemplo, activación de linfocitos T específicos del antígeno;
- (e) inhiben la fijación del ligando GITR a GITR en células 3A9-hGITR;
- (f) inhiben parcialmente, como máximo, la fijación del ligando GITR a GITR en linfocitos T activados;
- (g) se fijan al epítipo conformacional en GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4);
- (h) se fijan a GITR humano no glucosilado y glucosilado ligado a N y ligado a O;
- (i) tienen actividad agonista en ausencia de la fijación a un receptor Fc, pero en donde la fijación a un receptor Fc también mejora la actividad agonista; y
- (j) compiten en cualquier dirección o en ambas direcciones, para fijarse a GITR humano, con uno o más de los anticuerpos 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 y 6G10.

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR, o las porciones de fijación al antígeno de estos, descritos en la presente, estimulan una respuesta

inmunitaria antitumoral, por ejemplo, una respuesta de linfocitos T específicos del antígeno. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR, o las porciones de fijación al antígeno de estos, aumentan la producción de citocina (por ejemplo, IL-2 y/o IFN- γ) en linfocitos T que expresan GITR y/o aumentan la proliferación de linfocitos T.

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR, o las porciones de fijación al antígeno de estos, no se fijan a los receptores Fc. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR, o las porciones de fijación al antígeno de estos, se fijan a uno o más Fc γ R, por ejemplo, Fc γ R activadores o inhibidores.

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR, o las porciones de fijación al antígeno de estos, se fijan a GITR humano soluble con una K_D de 10 nM o menos como se mide por Biacore, se fijan a GITR humano unido a la membrana con una K_D de 1 nM o menos como se mide por Scatchard, se fijan a GITR humano unido a la membrana con un EC_{50} de 1 nM o menos como se mide por FACS, se fijan a GITR de *Macaca fascicularis* unido a la membrana con un EC_{50} de 10 nM o menos como se mide por FACS, inducen o mejoran la activación de linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T_{eff}, sin requerir reticulación multivalente, inhiben la fijación del ligando GITR a GITR con un EC_{50} de 1 μ g/ml o menos como se mide por FACS y/o se fijan a las regiones PTGGPGCGPGRLLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) y CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218) de GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4).

Se proporcionan en la presente anticuerpos monoclonales aislados, o las porciones de fijación al antígeno de estos, que se fijan específicamente a GITR y comprenden las tres CDR de la cadena pesada variable y las tres CDR de la cadena liviana variable que se encuentran en los pares de la cadena pesada variable y la cadena liviana variable seleccionados de:

- (a) SEQ ID NO: 13 y 14;
- (b) SEQ ID NO: 26 y 27;
- (c) SEQ ID NO: 39 y 40;
- (d) SEQ ID NO: 52 y 53;
- (e) SEQ ID NO: 52 y 54;
- (f) SEQ ID NO: 71 y 72;
- (g) SEQ ID NO: 84 y 85;
- (h) SEQ ID NO: 97 y 98;
- (i) SEQ ID NO: 97 y 99;
- (j) SEQ ID NO: 115 y 116;

- (k) SEQ ID NO: 128 y 129;
- (l) SEQ ID NO: 128 y 130; y
- (m) SEQ ID NO: 335 y 336.

Se proporcionan en la presente anticuerpos monoclonales aislados, o las porciones de fijación al antígeno de estos, que se fijan a GITR y comprenden:

(a) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 20, 21 y 22, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 23, 24 y 25, respectivamente;

(b) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 33, 34 y 35, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; o

(c) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 46, 47 y 48, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 49, 50 y 51, respectivamente;

(d) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 62, 63 y 64, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 65, 66 y 67, respectivamente;

(e) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 62, 63 y 64, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 68, 69 y 70, respectivamente;

(f) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 78, 79 y 80, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 81, 82 y 83, respectivamente;

(g) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 91, 92 y 93, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 94, 95 y 96, respectivamente;

(h) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 106, 107 y 108, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 109, 110 y 111, respectivamente;

(i) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 106, 107 y 108, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 112, 113 y 114, respectivamente;

(j) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 122, 123 y 124, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 125, 126 y 127, respectivamente;

(k) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 138, 139 y 140, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 141, 142 y 143, respectivamente;

(l) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 138, 139 y 140, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 144, 145 y 146, respectivamente; o

(m) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 342, 343 y 344, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 345, 346 y 347, respectivamente.

Se proporcionan en la presente anticuerpos monoclonales aislados, o las porciones de fijación al antígeno de estos, que se fijan a GITR y comprenden regiones variables de la cadena liviana y pesada, en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, 26, 39, 52, 71, 84, 97, 115, 128 y 335.

Se proporcionan en la presente anticuerpos monoclonales aislados, o las porciones de fijación al antígeno de estos, que se fijan a GITR y comprenden regiones variables de la cadena liviana y pesada, en donde la región variable de la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, 27, 40, 53, 54, 72, 85, 98, 99, 116, 129, 130 y 336.

Se proporcionan en la presente anticuerpos monoclonales aislados, o las porciones de fijación al antígeno de estos, que se fijan a GITR y comprenden secuencias de las regiones variables de la cadena liviana o pesada al menos 85 % idénticas, por ejemplo, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas, a las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

(a) SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente;

(b) SEQ ID NO: 26 y 27, respectivamente;

(c) SEQ ID NO: 39 y 40, respectivamente;

(d) SEQ ID NO: 52 y 53, respectivamente;

(e) SEQ ID NO: 52 y 54, respectivamente;

(f) SEQ ID NO: 71 y 72, respectivamente;

(g) SEQ ID NO: 84 y 85, respectivamente;

(h) SEQ ID NO: 97 y 98, respectivamente;

- (i) SEQ ID NO: 97 y 99, respectivamente;
- (j) SEQ ID NO: 115 y 116, respectivamente;
- (k) SEQ ID NO: 128 y 129, respectivamente;
- (l) SEQ ID NO: 128 y 130, respectivamente; y
- (m) SEQ ID NO: 335 y 336, respectivamente.

Se proporcionan en la presente anticuerpos monoclonales aislados, o las porciones de fijación al antígeno de estos, que se fijan a GITR y comprenden secuencias de la cadena liviana o pesada al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % 99 % o 100 % idénticas a las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) SEQ ID NO: 15 y 16, respectivamente;
- (b) SEQ ID NO: 17 y 19, respectivamente;
- (c) SEQ ID NO: 18 y 19, respectivamente;
- (d) SEQ ID NO: 28 y 29, respectivamente;
- (e) SEQ ID NO: 30 y 32, respectivamente;
- (f) SEQ ID NO: 31 y 32, respectivamente;
- (g) SEQ ID NO: 41 y 42, respectivamente;
- (h) SEQ ID NO: 43 y 45, respectivamente;
- (i) SEQ ID NO: 44 y 45, respectivamente;
- (j) SEQ ID NO: 55 y 56, respectivamente;
- (k) SEQ ID NO: 55 y 57, respectivamente;
- (l) SEQ ID NO: 58 y 60, respectivamente;
- (m) SEQ ID NO: 59 y 60, respectivamente;
- (n) SEQ ID NO: 58 y 61, respectivamente;
- (o) SEQ ID NO: 59 y 61, respectivamente;
- (p) SEQ ID NO: 73 y 74, respectivamente;
- (q) SEQ ID NO: 75 y 77, respectivamente;
- (r) SEQ ID NO: 76 y 77, respectivamente;
- (s) SEQ ID NO: 86 y 87, respectivamente;
- (t) SEQ ID NO: 88 y 90, respectivamente;
- (u) SEQ ID NO: 89 y 90, respectivamente;
- (v) SEQ ID NO: 102 y 104, respectivamente;
- (w) SEQ ID NO: 103 y 104, respectivamente;
- (x) SEQ ID NO: 100 y 101, respectivamente;
- (y) SEQ ID NO: 100 y 371, respectivamente;

(z) SEQ ID NO: 102 y 105, respectivamente;
(za) SEQ ID NO: 103 y 105, respectivamente;
(zb) SEQ ID NO: 117 y 118, respectivamente;
(zc) SEQ ID NO: 119 y 121, respectivamente;
(zd) SEQ ID NO: 120 y 121, respectivamente;
(ze) SEQ ID NO: 131 y 132, respectivamente;
(zf) SEQ ID NO: 134 y 136, respectivamente;
(zg) SEQ ID NO: 135 y 136, respectivamente;
(zh) SEQ ID NO: 131 y 133, respectivamente;
(zi) SEQ ID NO: 134 y 137, respectivamente;
(zj) SEQ ID NO: 135 y 137, respectivamente;
(zk) SEQ ID NO: 337 y 338, respectivamente;
(zl) SEQ ID NO: 339 y 341, respectivamente; y
(zm) SEQ ID NO: 340 y 341, respectivamente.

En algunas formas de realización, los anticuerpos monoclonales aislados, o las porciones de fijación al antígeno de estos, (a) se fijan al mismo epítipo en GITR como 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 y/o 6G10, y (b) inhiben la fijación de 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 y/o 6G10 a GITR en linfocitos T activados en al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % como se mide, por ejemplo, por FACS.

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR, o las porciones de fijación al antígeno de estos, se fijan dentro de las regiones PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) y CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218) de GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4). En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR, o las porciones de fijación al antígeno de estos, descritas en la presente, se fijan a ambos GITR humano y de *Macaca fascicularis*.

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR, o las porciones de fijación al antígeno de estos, son los anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o variantes de estos. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR, o las porciones de fijación al antígeno de estos, comprenden un Fc de IgG1 no efectora, por ejemplo, un Fc de IgG1 no efectora con las siguientes mutaciones: L234A, L235E, G237A, A330S y P331S. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR, o las porciones de fijación al antígeno de estos, comprenden un Fc con fijación, o con fijación mejorada, a FcγR activador, por ejemplo, con respecto a un Fc de IgG1 de tipo silvestre. En algunas formas de realización, los residuos de metionina en las regiones

CDR de los anticuerpos anti-GITR, o las porciones de fijación al antígeno de estos, se sustituyen por residuos de aminoácidos que no se someten a oxidación. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR, o las porciones de fijación al antígeno de estos, son anticuerpos humanos o humanizados.

Se proporcionan en la presente anticuerpos monoclonales aislados, o las porciones de fijación al antígeno de estos, que se fijan a GITR que comprenden una región constante de la cadena pesada modificada que comprende una bisagra de IgG2 y al menos uno de CH1, CH2 y CH3 que no es un isotipo IgG2, en donde el anticuerpo anti-GITR tiene actividad agonista mejorada con respecto al mismo anticuerpo anti-GITR pero con una bisagra de no IgG2.

En algunas formas de realización, la región constante de la cadena pesada modificada comprende una región constante de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 223-226 y 283-290, o una región constante de la cadena pesada que difiere de aquella en, como máximo, 5 aminoácidos o es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 223-226 y 283-290.

En algunas formas de realización, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 17, 18, 28, 30, 31, 41, 43, 44, 55, 58, 59, 73, 75, 76, 86, 88, 89, 100, 102, 103, 117, 119, 120, 131, 134, 135, 227-275, 337, 339, 340, 348-352, 361 y 362, o una cadena pesada que difiere de aquella en, como máximo, 10 aminoácidos o es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, 17, 18, 28, 30, 31, 41, 43, 44, 55, 58, 59, 73, 75, 76, 86, 88, 89, 100, 102, 103, 117, 119, 120, 131, 134, 135, 227-275, 337, 339, 340, 348-352, 361 y 362.

En algunas formas de realización, la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, 19, 29, 32, 42, 45, 56, 57, 60, 61, 74, 87, 90, 101, 104, 105, 118, 121, 132, 133, 136, 137, 338, 341 y 371, o una cadena liviana que difiere de aquella en, como máximo, 10 aminoácidos o es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, 19, 29, 32, 42, 45, 56, 57, 60, 61, 74, 87, 90, 101, 104, 105, 118, 121, 132, 133, 136, 137, 338, 341 y 371.

Se proporcionan en la presente moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-GITR ligado a una molécula que tiene una segunda especificidad de fijación.

Se proporcionan en la presente ácidos nucleicos que codifican las regiones

variables de la cadena liviana y/o pesada de los anticuerpos anti-GITR, o las porciones de fijación al antígeno de estos, en donde los vectores de expresión comprenden las moléculas de ácidos nucleicos, y las células se transforman con los vectores de expresión.

Se proporcionan en la presente inmunos conjugados que comprenden los anticuerpos anti-GITR descritos en la presente ligados a un agente.

Se proporcionan en la presente composiciones que comprenden anticuerpos anti-GITR, o las porciones de fijación al antígeno de estos, y un portador. También se proporcionan en la presente kits que comprenden los anticuerpos anti-GITR, o las porciones de fijación al antígeno de estos, y las instrucciones para su uso.

Se proporciona en la presente un método para preparar los anticuerpos anti-GITR, que comprende expresar un anticuerpo anti-GITR en una célula y aislar el anticuerpo de la célula.

Se proporciona en la presente un método para estimular una respuesta de linfocitos T específicos del antígeno que comprende poner en contacto el linfocito T con un anticuerpo anti-GITR, o una porción de fijación al antígeno de este, de modo que se estimule una respuesta de linfocitos T específicos del antígeno.

Se proporciona en la presente un método para activar o coestimular un linfocito T, por ejemplo, un linfocito T efector, que comprende poner en contacto una célula, por ejemplo, un linfocito T efector, con un anticuerpo anti-GITR, o una porción de fijación al antígeno de este, y CD3, en donde el linfocito T efector se activa o se coestimula.

Se proporciona en la presente un método para aumentar la producción de IL-2 y/o IFN- γ en un linfocito T y/o la proliferación de un linfocito T que comprende poner en contacto el linfocito T con una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-GITR, o una porción de fijación al antígeno de este.

Se proporciona en la presente un método para aumentar la producción de IL-2 y/o IFN- γ en linfocitos T en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-GITR, o una porción de fijación al antígeno de este, una molécula biespecífica o un conjugado que comprende el anticuerpo anti-GITR, o una composición que comprende el anticuerpo anti-GITR, para aumentar la producción de IL-2 y/o IFN- γ en linfocitos T.

Se proporciona en la presente un método para reducir o disminuir la cantidad de linfocitos T reguladores en un tumor de un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-GITR, o una porción de fijación al antígeno de este, una molécula biespecífica o un conjugado, en donde el anticuerpo, o

una porción de fijación al antígeno de este, tiene una función efectora o efectora mejorada, para reducir la cantidad de linfocitos T reguladores en el tumor.

Se proporciona en la presente un método para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-GITR, o una porción de fijación al antígeno de este, una molécula biespecífica o un conjugado al sujeto, de modo que se estimule una respuesta inmunitaria en el sujeto. En algunas formas de realización, el sujeto tiene un tumor, y se estimula una respuesta inmunitaria contra el tumor.

Se proporciona en la presente un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-GITR, o una porción de fijación al antígeno de este, una molécula biespecífica o un conjugado, de modo que el crecimiento del tumor se inhibe en el sujeto.

Se proporciona en la presente un método para tratar el cáncer, por ejemplo, mediante inmunoterapia, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-GITR, o una porción de fijación al antígeno de este, una molécula biespecífica o un conjugado que comprende el anticuerpo anti-GITR, o una composición que comprende el anticuerpo anti-GITR, para tratar el cáncer. En algunas formas de realización, el cáncer es cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer útero/cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de esófago, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de células germinales, cáncer óseo, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer de piel, neoplasma del sistema nervioso central, linfoma, leucemia, mieloma, sarcoma y cáncer relacionado con virus. En algunas formas de realización, el cáncer es un cáncer metastásico, cáncer refractario o cáncer recurrente.

En algunas formas de realización, los métodos descritos en la presente también comprenden administrar uno o más tratamientos adicionales con un anticuerpo anti-GITR, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD1, un anticuerpo LAG-3, un anticuerpo CTLA-4 y/o un anticuerpo PD-L1.

Se proporciona en la presente un método para detectar la presencia de GITR en una muestra que comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-GITR, o una porción de fijación al antígeno de este, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, y GITR, y detectar la formación de un complejo.

Se proporcionan en la presente usos de los anticuerpos anti-GITR descritos en la presente para tratar cáncer, estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto, estimular una respuesta de linfocitos T específicos del antígeno, activar o coestimular un linfocito T, aumentar la producción de IL-2 y/o IFN- γ en un linfocito T y/o la proliferación de un linfocito T, reducir o disminuir la cantidad de linfocitos T reguladores en un tumor y/o inhibir el crecimiento de células tumorales. También se proporcionan en la presente usos de los anticuerpos anti-GITR descritos en la presente para preparar un medicamento para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto, estimular una respuesta de linfocitos T específicos del antígeno, activar o coestimular un linfocito T, aumentar la producción de IL-2 y/o IFN- γ en un linfocito T y/o la proliferación de un linfocito T, reducir o disminuir la cantidad de linfocitos T reguladores en un tumor y/o inhibir el crecimiento de células tumorales.

Otras características y ventajas de la presente serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena liviana y pesada de anticuerpos monoclonales 28F3 (SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente), 18E10 (SEQ ID NO: 39 y 40, respectivamente) y 19D3 (SEQ ID NO: 26 y 27, respectivamente). Las CDR de VH y VL de 28F3 están subrayados.

La Figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 147) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 13) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 28F3. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 20), CDR2 (SEQ ID NO: 21) y CDR3 (SEQ ID NO: 22), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V, D y J.

La Figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 148) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 14) de la región variable de la cadena liviana kappa del anticuerpo monoclonal humano 28F3. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 23), CDR2 (SEQ ID NO: 24) y CDR3 (SEQ ID NO: 25), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V y J.

La Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 158) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 39) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 18E10. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 46), CDR2 (SEQ ID NO: 47) y CDR3 (SEQ ID NO: 48), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V, D y J.

La Figura 3B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 159) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 40) de la región variable de la cadena liviana kappa del anticuerpo monoclonal humano 18E10. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 49), CDR2 (SEQ ID NO: 50) y CDR3 (SEQ ID NO: 51), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V y J.

La Figura 4A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 154) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 26) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 19D3. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 33), CDR2 (SEQ ID NO: 34) y CDR3 (SEQ ID NO: 35), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V, D y J.

La Figura 4B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 155) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 27) de la región variable de la cadena liviana kappa del anticuerpo monoclonal humano 19D3. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 36), CDR2 (SEQ ID NO: 37) y CDR3 (SEQ ID NO: 38), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V y J.

La Figura 5A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 162) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 52) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 3C3. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 62), CDR2 (SEQ ID NO: 63) y CDR3 (SEQ ID NO: 64), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V, D y J.

La Figura 5B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 163) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 53) de la región variable de la cadena liviana kappa (VK1) del anticuerpo monoclonal humano 3C3. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 65), CDR2 (SEQ ID NO: 66) y CDR3 (SEQ ID NO: 67), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V y J.

La Figura 5C muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 164) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 54) de la región variable de la cadena liviana kappa (VK2) del anticuerpo monoclonal humano 3C3. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 68), CDR2 (SEQ ID NO: 69) y CDR3 (SEQ ID NO: 70), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V y J.

La Figura 6A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 168) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 71) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 2G6. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 78), CDR2 (SEQ ID NO: 79) y CDR3 (SEQ ID NO: 80), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V, D y J.

La Figura 6B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 169) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 72) de la región variable de la cadena liviana kappa del anticuerpo monoclonal humano 2G6. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 81), CDR2 (SEQ ID NO: 82) y CDR3 (SEQ ID NO: 83), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V y J.

La Figura 7A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 172) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 84) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 8A6. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 91), CDR2 (SEQ ID NO: 92) y CDR3 (SEQ ID NO: 93), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V, D y J.

La Figura 7B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 173) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 85) de la región variable de la cadena liviana kappa del anticuerpo monoclonal humano 8A6. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 94), CDR2 (SEQ ID NO: 95) y CDR3 (SEQ ID NO: 96), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V y J.

La Figura 8A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 176) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 97) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 9G7. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 106), CDR2 (SEQ ID NO: 107) y CDR3 (SEQ ID NO: 108), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V, D y J.

La Figura 8B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 177) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 98) de la región variable de la cadena liviana kappa (VK1) del anticuerpo monoclonal humano 9G7. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 109), CDR2 (SEQ ID NO: 110) y CDR3 (SEQ ID NO: 111), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V y J.

La Figura 8C muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 178) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 99) de la región variable de la cadena liviana kappa (VK2) del anticuerpo monoclonal humano 9G7. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 112), CDR2 (SEQ ID NO: 113) y CDR3 (SEQ ID NO: 114), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V y J.

La Figura 9A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 182) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 115) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 14E3. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 122), CDR2 (SEQ ID NO: 123) y CDR3 (SEQ ID NO: 124), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V, D y J.

La Figura 9B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 183) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 116) de la región variable de la cadena liviana kappa del anticuerpo monoclonal humano 14E3. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 125), CDR2 (SEQ ID NO: 126) y CDR3 (SEQ ID NO: 127), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V y J.

La Figura 10A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 186) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 128) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 19H8. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 138), CDR2 (SEQ ID NO: 139) y CDR3 (SEQ ID NO: 140), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V, D y J.

La Figura 10B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 187) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 129) de la región variable de la cadena liviana kappa (VK1) del anticuerpo monoclonal humano 19H8. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 141), CDR2 (SEQ ID NO: 142) y CDR3 (SEQ ID NO: 143), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V y J.

La Figura 10C muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 188) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 130) de la región variable de la cadena liviana kappa (VK2) del anticuerpo monoclonal humano 19H8. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 144), CDR2 (SEQ ID NO: 145) y CDR3 (SEQ ID NO: 146), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V y J.

La Figura 11A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 353) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 335) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 6G10. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 342), CDR2 (SEQ ID NO: 343) y CDR3 (SEQ ID NO: 344), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V, D y J.

La Figura 11B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 354) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 336) de la región variable de la cadena liviana kappa del anticuerpo monoclonal humano 6G10. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 345), CDR2 (SEQ ID NO: 346) y CDR3 (SEQ ID NO: 347), y se indican las derivaciones de las líneas germinales V y J.

La Figura 12 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 28F3 (SEQ ID NO: 13) con las secuencias de aminoácidos 3-33, 3-10 y JH6 de V_H de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 192, 193 y 196, respectivamente).

La Figura 13 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de la

región variable de la cadena liviana de 28F3 (SEQ ID NO: 14) con las secuencias de aminoácidos L18 y JK2 de V_k de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 204 y 205, respectivamente).

La Figura 14 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 18E10 (SEQ ID NO: 39) con las secuencias de aminoácidos 3-33, 6-19 y JH6 de V_H de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 192, 199 y 197, respectivamente).

La Figura 15 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de 18E10 (SEQ ID NO: 40) con las secuencias de aminoácidos L15 y JK2 de V_k de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 207 y 205, respectivamente).

La Figura 16 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 19D3 (SEQ ID NO: 26) con las secuencias de aminoácidos 3-33, 3-16 y JH6 de V_H de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 192, 200 y 198, respectivamente).

La Figura 17 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de 19D3 (SEQ ID NO: 27) con las secuencias de aminoácidos L15 y JK2 de V_k de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 207 y 205, respectivamente).

La Figura 18 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 3C3 (SEQ ID NO: 52) con las secuencias de aminoácidos 4-34 y JH3 de V_H de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 201 y 202, respectivamente).

La Figura 19A muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VK1) de 3C3 (SEQ ID NO: 53) con las secuencias de aminoácidos L15 y JK2 de V_k de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 207 y 205, respectivamente).

La Figura 19B muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VK2) de 3C3 (SEQ ID NO: 54) con las secuencias de aminoácidos L20 y JK2 de V_k de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 208 y 206, respectivamente).

La Figura 20 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 2G6 (SEQ ID NO: 71) con las secuencias de aminoácidos 3-33 y JH6 de V_H de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 192 y 197, respectivamente).

La Figura 21 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de 2G6 (SEQ ID NO: 72) con las secuencias de aminoácidos L15 y JK2 de V_k de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 207 y 205, respectivamente).

La Figura 22 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 8A6 (SEQ ID NO: 84) con las secuencias de aminoácidos 3-33, 3-10 y JH6 de V_H de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 192, 193 y 197, respectivamente).

La Figura 23 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de 8A6 (SEQ ID NO: 85) con las secuencias de aminoácidos L18 y JK2 de V_k de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 204 y 205, respectivamente).

La Figura 24 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 9G7 (SEQ ID NO: 97) con las secuencias de aminoácidos 3-15, 3-10 y JH6 de V_H de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 203, 194 y 198, respectivamente).

La Figura 25A muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VK1) de 9G7 (SEQ ID NO: 98) con las secuencias de aminoácidos A27 y JK1 de V_k de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 209 y 210, respectivamente).

La Figura 25B muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VK2) de 9G7 (SEQ ID NO: 99) con las secuencias de aminoácidos A27 y JK5 de V_k de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 209 y 212, respectivamente).

La Figura 26 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 14E3 (SEQ ID NO: 115) con las secuencias de aminoácidos 4-34 y JH3 de V_H de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 201 y 202, respectivamente).

La Figura 27 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de 14E3 (SEQ ID NO: 116) con las secuencias de aminoácidos L15 y JK1 de V_k de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 207 y 211, respectivamente).

La Figura 28 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 19H8 (SEQ ID NO: 128) con las secuencias de aminoácidos 3-33, 3-10 y JH6 de V_H de la línea germinal humana (SEQ

ID NO: 192, 195 y 196, respectivamente).

La Figura 29A muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VK1) de 19H8 (SEQ ID NO: 129) con las secuencias de aminoácidos L18 y JK1 de V_k de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 204 y 211, respectivamente).

La Figura 29B muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VK2) de 19H8 (SEQ ID NO: 130) con las secuencias de aminoácidos L6 y JK4 de V_k de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 213 y 214, respectivamente).

La Figura 30 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 6G10 (SEQ ID NO: 335) con las secuencias de aminoácidos 3-33, 3-10 y JH6 de V_H de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 192, 195 y 196, respectivamente).

La Figura 31 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (VK1) de 6G10 (SEQ ID NO: 336) con las secuencias de aminoácidos L18 y JK2 de V_k de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 204 y 205, respectivamente).

La Figura 32 muestra la afinidad de fijación (en nM) de diversos anticuerpos anti-GITR para linfocitos T humanos activados, sin anticuerpo, y controles de anticuerpos IgG1 y hIgG2, como se evaluó mediante FACS.

La Figura 33 muestra la afinidad de fijación (en nM) de diversos anticuerpos anti-GITR para linfocitos T de *Macaca fascicularis* activados, sin anticuerpo, y los anticuerpos hIgG1 y hIgG2 como controles, como se evaluó mediante FACS.

Las Figuras 34A y 34B muestran la capacidad de diversos anticuerpos anti-GITR para inhibir la fijación del ligando GITR (GITR-L) a células GITR 3A9, con hIgG1, hIgG2, sin anticuerpo, y células solas como controles.

La Figura 34C muestra la fijación de GITR-L recombinante a linfocitos T CD4 y CD8 humanos activados.

La Figura 34D muestra que GITR-L bloquea parcialmente la fijación de 28F3-hIgG1 a linfocitos T CD4+ humanos activados. La fijación de 28F3-hIgG1 en una concentración fija de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a linfocitos T activados se bloqueó parcialmente mediante GITR-L previamente unido con un IC_{50} de 0,0024 $\mu\text{g/ml}$.

La Figura 34E muestra que 28F3-hIgG1 no bloquea la fijación de 0,6 $\mu\text{g/ml}$ de GITR-L a linfocitos T humanos activados. Cuando GITR-L se agregó a los linfocitos T CD4+ a 0,6 mg/ml , aproximadamente 90 % de saturación, 28F3-hIgG1 previamente

unido no pudo bloquear GITR-L que varía de 100 mg/ml a 0,00056 mg/ml.

La Figura 34F muestra que 28F3-hlgG1 bloquea parcialmente la fijación de 0,02 µg/ml de GITR-L a linfocitos T humanos activados. La fijación de GITR-L en una concentración fija de 20 ng/ml a linfocitos T activados se bloqueó parcialmente mediante 28F3-hlgG1 previamente unido con un IC50 de 0,075 µg/ml.

La Figura 35A muestra una transferencia Western que demuestra que el anticuerpo anti-GITR 28F3 se fija a GITR humano nativo, pero no desnaturalizado, y que la fijación no está afectada por la presencia o ausencia de glucosilación ligada a N. Un signo “+” indica muestras tratadas con PNGasa F para retirar la glucosilación ligada a N.

La Figura 35B es un gel teñido de azul Coomassie que muestra la presencia de todas las formas de GITR humano antes de transferirse a la nitrocelulosa para el análisis de transferencia Western.

Las Figuras 36A-36B muestran la fijación de los anticuerpos 28F3 y 3C3 a los fragmentos de GITR nativo generados mediante digestión con endoproteinasa Arg-C (1), endoproteinasa Lys-C (2), tripsina (3), endoproteinasa Glu-C (4) o endoproteinasa Asp-N (5).

La Figura 37 muestra una vista del mapa de calor del anticuerpo anti-GITR 28F3 que se fija a los fragmentos del péptido GITR humano generados de la digestión de una proteína GITR humana nativa con endoproteinasa Glu-C y tripsina (“Glu-C y tripsina”), endoproteinasa Arg-C (“Arg-C”), endoproteinasa Lys-C y tripsina (“Lys-C y tripsina”), tripsina, o endoproteinasa Asp-N y endoproteinasa Glu-C (“AspN y GluC”), lo que identifica la ubicación del epítipo al que el anticuerpo 28F3 se fija (región recuadrada). La secuencia de aminoácidos del dominio extracelular maduro de GITR humano se muestra en gris oscuro, y la secuencia de Fc de ratón, ligado mediante el terminal C a este, se muestra en gris claro.

La Figura 38A muestra los péptidos en la fracción de flujo, después de la incubación de las microesferas recubiertas con 28F3 para obtener péptidos que surgen de la digestión de tripsina de GITR humano nativo.

La Figura 38B muestra dos péptidos principales unidos a 28F3 (indicado por un asterisco).

La Figura 38C muestra la identificación mediante LC-MS del primero de los dos picos en la Figura 34B que corresponde al péptido del terminal N que tiene la secuencia que se mostró y sin glucosilación ligada a O.

La Figura 38D muestra la identificación mediante LC-MS del segundo de los

dos picos en la Figura 34B que corresponde al péptido del terminal N que tiene la secuencia que se mostró y que tiene una glucosilación ligada a O en T20.

La Figura 38E muestra el péptido GITR restante después de la digestión *in situ* con endoproteinasa Asp-N de un péptido más largo que se incubó junto con 28F3.

La Figura 39A muestra una lista de péptidos pépticos para GITR/Fc humano recombinante y el complejo proteico de GITR/Fc humano recombinante y 28F3 IgG1, lo que logra una cobertura de secuencia de 86 % para la región del terminal N de GITR.

La Figura 39B muestra los niveles de absorción de deuterio mediante espectrometría de masa (MS) HDX en ausencia/presencia de mAb 28F3 IgG1 ("GITR.6").

La Figura 39C muestra las dos regiones en el GITR humano maduro unido por 28F3, como se determina mediante MS HDX.

La Figura 40 muestra los efectos de diversos anticuerpos agonistas anti-GITR en la secreción de IL-2 mediante células 3A9-hGITR en presencia de anticuerpos anti-CD3 unidos a placas.

La Figura 41A muestra los efectos de los anticuerpos agonistas anti-GITR 18E10, 13H2 (iguales a 28F3) y 28F3 en la secreción de IL-2 en células 3A9-hGITR activadas por un antígeno específico.

La Figura 41B muestra los efectos de los anticuerpos agonistas anti-GITR 3C3 (que se muestran como "GITR.3"), 28F3, 19D3 y 18E10 en la secreción de IL-2 en células 3A9-hGITR activadas por un antígeno específico.

La Figura 42A muestra los efectos de diversos anticuerpos agonistas anti-GITR de HuMab en la secreción de interferones gamma (IFN- γ) en linfocitos T estimulados con células CHO-OKT3 (es decir, células CHO que expresan OKT3 scfv).

La Figura 42B muestra los efectos del anticuerpo agonista anti-GITR 28F3 en la secreción de IL-2 en linfocitos T CD4+ estimulados con células CHO que expresan OKT3, en donde los linfocitos T son del primer donante.

La Figura 42C muestra los efectos del anticuerpo anti-GITR 28F3 en la secreción de IFN- γ en linfocitos T CD4+ estimulados con células CHO que expresan OKT3, en donde los linfocitos T son del primer donante.

La Figura 42D muestra los efectos del anticuerpo anti-GITR 28F3 en la secreción de IL-2 en linfocitos T CD4+ estimulados con células CHO que expresan OKT3, en donde los linfocitos T son del segundo donante.

La Figura 42E muestra los efectos del anticuerpo anti-GITR 28F3 en la

secreción de IFN- γ en linfocitos T CD4⁺ estimulados con células CHO que expresan OKT3, en donde los linfocitos T son del segundo donante.

La Figura 43 muestra los efectos del anticuerpo anti-GITR 28F3 (IgG2), el fragmento de 28F3-F(ab')₂ y 28F3-Fab en la secreción IL-2 en células 3A9-hGITR estimuladas con células LK35.2 en presencia del péptido HEL48-63.

La Figura 44 muestra la inmunohistoquímica de muestras de amígdalas humanas con el anticuerpo monoclonal 28F3-FITC.

Las Figuras 45A-45D muestran los efectos de diferentes isotipos del anticuerpo GITR anti-ratón de rata, DTA-1, durante actividad antitumoral medida a través de los cambios en los volúmenes tumorales en ratones individuales tratados con estos isotipos en un modelo de adenocarcinoma de colon MC38: (Figura 45A) Anticuerpo IgG1 de ratón de control (10 mg/kg); (Figura 45B) DTA-1 IgG2b de rata (10 mg/kg); (Figura 45C) DTA-1 IgG1 de ratón (10 mg/kg); (Figura 45D) DTA-1 IgG2a de ratón (10 mg/kg). La cantidad de ratones libres de tumores (TF) por grupo se muestra para cada grupo de 10 ratones.

Las Figuras 46A y 46B muestran los cambios en la media (Figura 46A) y la mediana (Figura 46B) del volumen tumoral de tumores MC38 en grupos de ratones tratados con anticuerpos DTA-1 (10 mg/kg) de diferentes isotipos.

Las Figuras 47A-47F muestran un análisis citométrico de flujo de bazo (Figuras 47A-47C) y linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) (Figuras 47D-47F) de ratones con tumores MC38 tratados con los diferentes isotipos anti-GITR (DTA-1) y anti-CTLA-4 (9D9) y el anticuerpo de control indicado. (Figura 47A) Porcentaje de linfocitos T CD8⁺ en el bazo; (Figura 47B) Porcentaje de linfocitos CD4⁺ en el bazo; (Figura 47C) Porcentaje de linfocitos CD4⁺ que también son Foxp3⁺ en el bazo; (Figura 47D) Porcentaje de linfocitos T CD8⁺ en TIL; (Figura 47E) Porcentaje de linfocitos CD4⁺ en TIL; (Figura 47F) Porcentaje de linfocitos CD4⁺ que también son Foxp3⁺ en TIL.

Las Figuras 48A-48F muestran los efectos de diferentes isotipos del anticuerpo GITR anti-ratón de rata, DTA-1, modificado nuevamente por ingeniería genética para minimizar la agregabilidad (denominado "mGITR.7") durante actividad antitumoral medida a través de los cambios en los volúmenes tumorales en ratones individuales tratados con estos isotipos en un modelo MC38: (Figura 48A) Anticuerpo IgG1 de ratón de control; (Figura 48B) mGITR.7 mIgG1; (Figura 48C) mGITR.7 mIgG1-D265A; (Figura 48D) mGITR.7 mIgG2a; (Figura 48E) mGITR.7 mIgG2b; (Figura 48F) mGITR.7 IgG2b de rata. La cantidad de ratones libres de tumores por grupo se muestra para cada grupo de 9 ratones.

Las Figuras 49A y 49B muestran los cambios en la media (Figura 49A) y la mediana (La Figura 49B) del volumen tumoral de tumores MC38 en grupos de ratones tratados con anticuerpos DTA-1 modificados nuevamente por ingeniería genética de isotipos diferentes.

Las Figuras 50A y 50B muestran un análisis citométrico de flujo de los efectos de diferentes DTA-1 (anticuerpos “mGITR” DTA-1 modificados nuevamente por ingeniería genética o los anticuerpos “DTA-1” originalmente modificados por ingeniería genética) y los isotipos anti-CTLA-4 (9D9) en T_{regs} Foxp3⁺/CD4⁺ en bazos (Figura 50A) y TIL (Figura 50B) de ratones con tumores MC38.

Las Figuras 51A-51E muestran la actividad antitumoral de diferentes isotipos DTA-1 de ratón en un modelo de fibrosarcoma Sa1N de ratón medida a través de los cambios en los volúmenes tumorales de ratones individuales tratados con esos isotipos: (Figura 51A) Anticuerpo IgG1 de ratón de control; (Figura 51B) DTA-1 IgG2a de ratón; (Figura 51C) DTA-1 IgG2b de rata; (Figura 51D) DTA-1 IgG1 de ratón; (Figura 51E) DTA-1 IgG1-D265A de ratón. La cantidad de ratones libres de tumores por grupo se muestra para cada grupo de hasta 10 ratones.

Las Figuras 52A y 52B muestran los cambios en la media (Figura 52A) y la mediana (Figura 52B) del volumen tumoral de tumores Sa1N en grupos de ratones tratados con anticuerpos DTA-1 de diferentes isotipos.

Las Figuras 53A y 53B muestran los efectos de diferentes isotipos anti-CTLA-4 (9D9) y DTA-1 en T_{regs} Foxp3⁺/CD4⁺ en bazos (Figura 53A) y TIL (Figura 53B) de los ratones con tumores Sa1N.

Las Figuras 54A-54D muestran los efectos del anticuerpo anti-GITR de rata, DTA-1, en volumen tumoral usando un modelo de adenocarcinoma de colon MC38 en etapas. Los ratones se trataron con (Figura 54A) mIgG1 de control, (Figura 54B) mIgG + DTA-1, (Figura 54C) mIgG + PD-1 (Figura 54D) PD-1 + DTA-1 los días 7, 10 y 14. La cantidad de ratones libres de tumores (TF) por grupo se muestra para cada grupo de 10 ratones.

Las Figuras 55A y 55B muestran en efecto de diversas combinaciones de mutaciones en CDR3 de VH en el anticuerpo anti-GITR 28F3 sobre la fijación a células 3A9-hGITR.

Las Figuras 56A-56F muestran los efectos de diversas combinaciones de mutaciones en CDR3 de VH en el anticuerpo anti-GITR 28F3 en el nivel de la secreción de IL-2 de las células 3A9-hGITR en presencia de anti-CD3 unido a placas.

La Figura 57 muestra la afinidad de fijación de los anticuerpos anti-GITR

indicados para los linfocitos T activados. Los anticuerpos evaluados comprendían una de las siguientes regiones constantes de la cadena pesada: una región constante de IgG1 ("anti-GITR.g1f"), una región constante de IgG1 no efectora ("anti-GITR.g1.1f"), una región constante de IgG2 ("anti-GITR-G2"), una bisagra de IgG2 y un dominio Fc de IgG1 ("anti-GITR.G2.G1f") y una bisagra de IgG2 y un dominio Fc de IgG1 no efectora ("anti-GITR.G2.G1.1f").

Las Figuras 58A-58C muestran la secreción de IFN- γ y IL-2 de linfocitos T CD4 de donante estimulados con anticuerpos GITR antihumanos solubles con diferentes regiones constantes de la cadena pesada. La Figura 58A muestra la secreción de IFN- γ de linfocitos T CD4 de donante estimulados con células CHO que expresan OKT3 y diversas concentraciones de anticuerpos GITR antihumanos con una región constante de IgG2-IgG1. La Figura 58B muestra la secreción de IL-2 de linfocitos T CD4 de donante estimulados con células CHO que expresan OKT3 y diversas concentraciones de un dominio constante de la cadena pesada de IgG1 o un dominio constante de la cadena pesada híbrida de IgG2-IgG1. La Figura 58C muestra la secreción de IL-2 de linfocitos T CD4 de donante estimulados con células CHO que expresan OKT3 y diversas concentraciones de versiones no efectoras (IgG1.1) de los anticuerpos en las Figuras 55A y B.

La Figura 59 muestra una comparación de los anticuerpos anti-GITR indicados en la secreción de IL-2 de células 3A9-hGITR en presencia de anti-CD3 unido a placas.

Las Figuras 60A-60D muestran el efecto de 28F3.IgG1 y 28F3.IgG1.1 en la proliferación de linfocitos Treg y Teff.

Las Figuras 61A-61F muestran el efecto de 28F3.IgG1 ("GITR.6IgG1") y 28F3.IgG1.1 ("GITR.6IgG1.1") durante la lisis inducida por células NK de linfocitos CD4+, linfocitos CD8+ y linfocitos enriquecidos por Treg de dos donantes diferentes.

Las Figuras 62A-62C muestran el efecto de un anticuerpo de control hIgG1, 28F3.IgG1 ("anti-GITR IgG1") y 28F3.IgG1.1 ("anti-GITR IgG1.1") en el crecimiento de tumores MC38.

Las Figuras 63A y 63B muestran la media y la mediana del volumen, respectivamente, de tumores MC38 en ratones tratados con anticuerpo de control hIgG1, 28F3.IgG1 ("anti-GITR IgG1") y 28F3.IgG1.1 ("anti-GITR IgG1.1").

Las Figuras 64A y 64B muestran la media del % de cambios en el peso corporal y la mediana del % de cambios en el peso corporal, respectivamente, de ratones con tumores MC38 tratados con anticuerpo de control hIgG1, 28F3.IgG1 ("anti-

GITR IgG1") y 28F3.IgG1.1 ("anti-GITR IgG1.1").

La Figura 65 muestra los efectos de 28F3.IgG1 ("GITR IgG1"), con respecto al control del isotipo, en la reducción de linfocitos Treg en el modelo de tumores MC38.

La Figura 66 muestra los efectos de 28F3.IgG1 ("GITR IgG1"), con respecto al control del isotipo, en el porcentaje de linfocitos T CD8+ en el modelo de tumores MC38.

La Figura 67 muestra el efecto de 28F3.IgG1 soluble y reticulado ("GITR.6IgG1") y 28F3.IgG1.1 ("GITR.6IgG1.1") en la secreción de IFN- γ de linfocitos T cuando se cocultiva con células CHO-OKT3 y CHO-OKT3-CD32a.

La Figura 68 muestra el efecto de 28F3.IgG1 soluble y reticulado ("GITR.6IgG1") y 28F3.IgG1.1 ("GITR.6IgG1.1") en la proliferación de linfocitos T cuando se cocultiva con CHO-OKT3 y células CHO-OKT3-CD32a.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se describen en la presente anticuerpos aislados, en particular, anticuerpos monoclonales, por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos, que se fijan específicamente a GITR y así activan la señalización de GITR corriente abajo ("anticuerpos agonistas anti-GITR"). En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente derivan de secuencias particulares de la línea germinal de la cadena liviana y pesada y/o comprenden características estructurales particulares, tales como regiones CDR que comprenden secuencias de aminoácidos particulares. Se proporcionan en la presente anticuerpos aislados, métodos para la preparación de tales anticuerpos, inmunoconjugados y moléculas biespecíficas que comprenden tales anticuerpos, y composiciones farmacéuticas formuladas para contener los anticuerpos. También se proporcionan en la presente métodos para usar los anticuerpos para mejorar la respuesta inmunitaria, sola o en combinación con otros agentes inmunoestimuladores (por ejemplo, anticuerpos) y/o tratamientos contra el cáncer. En consecuencia, los anticuerpos anti-GITR descritos en la presente se pueden usar en un tratamiento con una amplia variedad de aplicaciones terapéuticas, que incluyen, por ejemplo, inhibir el crecimiento tumoral y tratar infecciones virales.

Definiciones

A fin de comprender mejor la presente descripción, primero se definen ciertos términos. Las definiciones adicionales se indican a lo largo de la descripción detallada.

Como se usa en la presente, las expresiones "receptor de TNF inducible por glucocorticoides" o "GITR" se refieren a un receptor que es miembro de la superfamilia del receptor de TNF, que se fija al ligando GITR (GITR-L). GITR también se define

como miembro 18 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF18), AITR y CD357. El término "GITR" incluye cualquier variante o isoforma de GITR que se expresa naturalmente mediante células. En consecuencia, los anticuerpos descritos en la presente pueden presentar reactividad cruzada con GITR de especies que no son el ser humano (por ejemplo, GITR de *Macaca fascicularis*). De manera alternativa, los anticuerpos pueden ser específicos para GITR humano y pueden no exhibir ninguna reactividad cruzada con otras especies. GITR, o cualquier variante e isoforma de este, puede estar aislado de las células o los tejidos que lo expresa naturalmente o se puede producir en forma recombinante usando técnicas conocidas en el estado de la técnica y/o aquellas descritas en la presente.

Se han identificado tres isoformas de GITR humano que comparten el mismo dominio extracelular, excepto su porción del terminal C. La variante 1 (N.º de acceso NP_004186; SEQ ID NO: 1) consiste en 241 aminoácidos y representa la transcripción más larga. Contiene un segmento de codificación adicional que produce un desplazamiento de marco, en comparación con la variante 2. La proteína resultante (isoforma 1) contiene un terminal C distinto y más corto, en comparación con la isoforma 2. La variante 2 (N.º de acceso NP_683699; SEQ ID NO: 2) codifica la proteína más larga (isoforma 2), que consiste en 255 aminoácidos, y es soluble. La variante 3 (N.º de acceso NP_683700; SEQ ID NO: 3) contiene un segmento de codificación adicional que produce un desplazamiento de marco, en comparación con la variante 2. La proteína resultante (isoforma 3) contiene un terminal C distinto y más corto, en comparación con la isoforma 2, y consiste en 234 aminoácidos.

A continuación se encuentran secuencias de aminoácidos de las tres isoformas de GITR humano, GITR de *Macaca fascicularis* y GITR-L.

Isoforma 1 de GITR humano (N.º de acceso NP_004186; SEQ ID NO: 1; codificada mediante la secuencia de nucleótidos que tiene el N.º de acceso NM_004195.2):

MAQHGMGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTR
CCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGF
QCIDCASGTFSGGHEGHCKPWT DCTQFGFLTVPGNKTHNAVCPGSPPAEPLGWL
TVLLAVAACVLLLTSAQLGLHIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPSTEDARSCQFP
EERGERSAEEKGRLGDLWV

Isoforma 2 de GITR humano (N.º de acceso NP_683699.1; SEQ ID NO: 2; codificada mediante la secuencia de nucleótidos que tiene el N.º de acceso NM_148901.1):

MAQHGMGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTR
CCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGF
QCIDCASGTFSGGHEGHCKPWTDCWRCRRRPKTPEAASSPRKSGASDRQRRRG
GWETCGCEPGRPPGPPTAASPSPGAPQAAGALRSALGRALLPWQQKWVQEGGSD
QRPGPCSSAAAAGPCRRERETQSWPPSSLAGPDGVGS

Isoforma 3 de GTR humano (N.º de acceso NP_683700.1; SEQ ID NO: 3; codificada mediante la secuencia de nucleótidos que tiene el N.º de acceso NM_148902.1):

MAQHGMGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTR
CCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGF
QCIDCASGTFSGGHEGHCKPWTDCQFGFLTVPFGNKTHNAVCPGSPPAEPLGWL
TVVLLAVAACVLLLTSAQLGLHIWQLRKTQLLLEVPSTEDARSCQFPPEERGERSAE
EKGRGLDLWV

La secuencia de señales de las isoformas 1-3 corresponde a los aminoácidos 1-25. Por ende, las isoformas maduras 1, 2 y 3 consisten en los aminoácidos 26 a 241, 255 o 234, respectivamente. El dominio extracelular de GTR maduro consiste en aminoácidos 26-162 y tiene la secuencia de aminoácidos:

QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEF
HCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWTDC
TQFGFLTVPFGNKTHNAVCPGSPPAEP (SEQ ID NO: 4)

Secuencia de proteínas GTR de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 5):

MCASGTLCCALLCAASLGQRPTGGPGCGPGRLLLGTGKDARCCRVHPTTRCCRDYQ
GEECCSEWDCVCVQPEFHCGNPCCTTCQHHPCPSGQGVQPQKFSFGFRVCVDC
LGTFSRGHDGHCKPWTDCQFGFLTVPFGNKTHNAVCPGSPPAEPPGWLTIILLAV
AACVLLLTSAQLGLHIWQLRSQPTGPRETQLLLEVPSTEDASSCQFPPEERGERLAE
EKGRGLDLWV

Secuencia de proteínas GTR-L humano (N.º de acceso NP_005083.2; SEQ ID NO: 6):

MTLHPSPITCEFLFSTALISPKMCLSHLENMPLSHSRTQGAQRSSWKLWLFCSIVmILF
LCSFSWLIFIFLQLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLY
LIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDTIDLIFNS
EHQVLKNNTYWGILLANPQFIS

Como se usa en la presente, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de fijación al antígeno (es decir, "porciones de fijación al antígeno") o cadenas simples de estos. En una forma de realización, un "anticuerpo"

se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) interconectadas por puentes de disulfuro, o una porción de fijación al antígeno de estas. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (que se abrevia en la presente como V_H) y una región constante de la cadena pesada. En determinados anticuerpos naturales, la región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. En determinados anticuerpos naturales, cada cadena liviana está compuesta por una región variable de la cadena liviana (que se abrevia en la presente como V_L) y una región constante de la cadena liviana. La región constante de la cadena liviana está compuesta por un dominio, CL. Las regiones V_H y V_L también se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino hasta el terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena liviana contienen un dominio de fijación que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la fijación de la inmunoglobulina a los tejidos huésped o factores, incluso varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

En general, los anticuerpos se fijan específicamente a su antígeno cognado con alta afinidad, que se refleja mediante la constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-11} M o menos. Cualquier K_D mayor de alrededor de 10^{-4} M indica, en general, fijación no específica. Como se usa en la presente, un anticuerpo que "se fija específicamente" a un antígeno significa un anticuerpo que se fija al antígeno y a antígenos sustancialmente idénticos con alta afinidad, lo que significa que tiene una K_D de 10^{-7} M o menos, preferentemente, 10^{-8} M o menos, aun con mayor preferencia, 5×10^{-9} M o menos, y con máxima preferencia, de 10^{-8} M a 10^{-10} M o menos, pero no se fija con alta afinidad a antígenos no relacionados. Un antígeno es "sustancialmente idéntico" a un antígeno específico si exhibe un alto grado de identidad de secuencia al antígeno específico, por ejemplo, si exhibe al menos 80 %, al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 97 %, o aun con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia a la secuencia del antígeno específico. A modo de ejemplo, un anticuerpo que se fija específicamente a GITR humano también puede tener reactividad cruzada con antígenos GITR de

determinadas especies de primates (por ejemplo, GTR de *Macaca fascicularis*), pero pueden no tener reactividad cruzada con antígenos GTR de otras especies o con un antígeno que no es GTR.

Una inmunoglobulina puede provenir de cualquier isotipo comúnmente conocido, que incluye, entre otros, IgA, IgA secretora, IgG y IgM. El isotipo IgG se divide en subclases en determinadas especies: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 en seres humanos, e IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 en ratones. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GTR descritos en la presente pertenecen al subtipo IgG1 o IgG2. Las inmunoglobulinas, por ejemplo, IgG1, existen en diversos alotipos, que difieren entre sí en algunos aminoácidos como máximo. "Anticuerpo" incluye, a modo de ejemplo, anticuerpos naturales y no naturales; anticuerpos monoclonales y policlonales; anticuerpos quiméricos y humanizados; anticuerpos humanos y no humanos; anticuerpos totalmente sintéticos; y anticuerpos monocatenarios.

Como se usa en la presente, la expresión "porción de fijación al antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de fijarse específicamente a un antígeno (por ejemplo, GTR humano). Estos "fragmentos" tienen, por ejemplo, de alrededor de 8 a alrededor de 1500 aminoácidos de longitud, en forma adecuada, de alrededor de 8 a alrededor de 745 aminoácidos de longitud, en forma adecuada, de alrededor de 8 a alrededor de 300, por ejemplo, de alrededor de 8 a alrededor de 200 aminoácidos, o de alrededor de 10 a alrededor de 50 o 100 aminoácidos de longitud. Se ha demostrado que la función de fijación al antígeno de un anticuerpo se puede llevar a cabo mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de fijación comprendidos por la expresión "porción de fijación al antígeno" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-GTR descrito en la presente, incluye (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , CL y $CH1$; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento F_d que consiste en los dominios V_H y $CH1$; (iv) un fragmento F_v que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada o (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que se pueden unir opcionalmente mediante un ligador sintético. Además, si bien los dos dominios del fragmento F_v , V_L y V_H , son codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que

permite obtenerlos como una cadena proteica simple en donde las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como cadena simple Fv (scFv)); véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). La expresión "porción de fijación al antígeno" de un anticuerpo también abarca dichos anticuerpos monocatenarios. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen mediante técnicas convencionales conocidas por las personas del oficio de nivel medio, y los fragmentos se analizan para determinar la utilidad de la misma manera que con los anticuerpos intactos. Las porciones de fijación al antígeno se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

Un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de las cadenas pesadas/livianas diferentes y dos sitios de fijación diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante diversos métodos que incluyen la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

Como se usa en la presente, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que muestra una sola especificidad y afinidad de fijación para un epítipo particular o una composición de anticuerpos en donde todos los anticuerpos muestran una sola especificidad y afinidad de fijación para un epítipo particular. En consecuencia, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a un anticuerpo o una composición de anticuerpos que muestran una sola especificidad de fijación y que tiene regiones constantes opcionales y variables derivados de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. En una forma de realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen mediante un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena liviana fusionados a una célula inmortalizada.

Como se usa en la presente, la expresión "anticuerpo humano recombinante" incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para los genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparados de estos, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una colección de anticuerpos humanos combinatoria

recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por otros medios que incluyen el empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Los anticuerpos humanos recombinantes comprenden regiones variables y constantes que utilizan secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana particulares codificadas por genes de la línea germinal, pero incluye redistribuciones y mutaciones posteriores que ocurren, por ejemplo, durante la maduración de anticuerpos. Como se conoce en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, Lonberg (2005) Nature Biotech. 23(9):1117-1125), la región variable contiene el dominio de fijación al antígeno, que se codifica mediante diversos genes que se redistribuyen para formar un anticuerpo específico para un antígeno exógeno. Además de la redistribución, la región variable también se puede modificar mediante múltiples cambios de aminoácidos simples (denominado mutación somática o hipermutación) para aumentar la afinidad del anticuerpo del antígeno exógeno. La región constante cambiará en respuesta adicional a un antígeno (es decir, cambio de isotipo). Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico somáticamente mutadas y redispuestas que codifican los polipéptidos de inmunoglobulina de la cadena liviana o de la cadena pesada en respuesta a un antígeno pueden no tener identidad de secuencia con las moléculas de ácido nucleico originales, pero serán sustancialmente idénticas o similares (es decir, tienen al menos 80 % de identidad).

Un anticuerpo "humano" (HuMAb) se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables en donde las regiones de marco y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Asimismo, si el anticuerpo contiene una región constante, esta también deriva de las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos descritos en la presente pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas al azar, mutagénesis específica de sitio *in vitro* o mutación somática *in vivo*). Sin embargo, como se usa en la presente, la expresión "anticuerpo humano" no incluye anticuerpos en donde las secuencias CDR que derivan de la línea germinal de otras especies de mamíferos, como ratón, se injertaron en secuencias de marco humanas. Las expresiones "anticuerpos humanos" y "anticuerpos totalmente humanos" se usan como sinónimos.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo en donde algunos o la mayoría de los aminoácidos, o todos ellos, fuera de los dominios CDR de un anticuerpo no humano se reemplazan con los aminoácidos correspondientes que derivan de inmunoglobulinas humanas. En una forma de realización, una forma

humanizada de un anticuerpo, algunos o la mayoría de los aminoácidos, o todos ellos, fuera de los dominios CDR se reemplazaron por aminoácidos de inmunoglobulinas humanas, mientras que algunos o la mayoría de los aminoácidos, o todos ellos, dentro de una o más regiones CDR no cambian. Se puede permitir pequeñas adiciones, eliminaciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos siempre que no anulen la capacidad del anticuerpo de fijarse a un antígeno particular. Un anticuerpo "humanizado" retiene una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original.

Un "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en donde las regiones variables se derivan de una especie, y las regiones constantes se derivan de otras especies, tales como un anticuerpo en donde las regiones variables se derivan de un anticuerpo de ratón, y las regiones constantes se derivan de un anticuerpo humano.

Como se usa en la presente, "isotipo" se refiere a una clase de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE) que son codificados por genes de la región constante de la cadena pesada.

"Alotipo" se refiere a variantes naturales dentro de un grupo de isotipos específico, cuyas variantes difieren en algunos aminoácidos (véase, por ejemplo, Jefferis *et al.* (2009) mAbs 1:1). Los anticuerpos descritos en la presente pueden pertenecer a cualquier alotipo. Como se usan en la presente, los anticuerpos denominados "IgG1f" o isotipo "IgG1.1f" son los anticuerpos IgG1 y IgG1.1 no efectores, respectivamente, del alotipo "f", es decir, que tienen 214R, 356E y 358M de acuerdo con el índice EU como en Kabat, como se muestra, por ejemplo, en SEQ ID NO: 7 (véanse los residuos subrayados en SEQ ID NO: 7 de la Tabla 11).

Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan en la presente de manera indistinta con la frase "un anticuerpo que se fija específicamente a un antígeno".

Como se usa en la presente, "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se fija específicamente a GITR está sustancialmente libre de anticuerpos que se fijan específicamente a antígenos que no son GITR). Un anticuerpo aislado que se fija específicamente a un epítipo de GITR puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otras proteínas GITR de diferentes especies.

Como se usa en la presente, un anticuerpo que "inhibe la fijación de GITR-L a GITR" se refiere a un anticuerpo que inhibe la fijación de GITR-L a GITR, por ejemplo,

en ensayos de fijación usando células 3A9-hGITR, con un EC50 de alrededor de 1 µg/ml o menos, tal como alrededor de 0,9 µg/ml o menos, alrededor de 0,85 µg/ml o menos, alrededor de 0,8 µg/ml o menos, alrededor de 0,75 µg/ml o menos, alrededor de 0,7 µg/ml o menos, alrededor de 0,65 µg/ml o menos, alrededor de 0,6 µg/ml o menos, alrededor de 0,55 µg/ml o menos, alrededor de 0,5 µg/ml o menos, alrededor de 0,45 µg/ml o menos, alrededor de 0,4 µg/ml o menos, alrededor de 0,35 µg/ml o menos, alrededor de 0,3 µg/ml o menos, alrededor de 0,25 µg/ml o menos, alrededor de 0,2 µg/ml o menos, alrededor de 0,15 µg/ml o menos, o alrededor de 0,1 µg/ml o menos, en métodos reconocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, ensayos de fijación basados en FACS descritos en el presente.

Una "función efectora" se refiere a la interacción de una región Fc del anticuerpo con receptor o ligando Fc, o el evento bioquímico que resulta de aquella. Las "funciones efectoras" de ejemplo incluyen fijación a Clq, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), fijación al receptor Fc, funciones efectoras mediadas por FcγR, tales como ADCC y fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCP), y la regulación descendiente de un receptor de la superficie celular (*por ejemplo*, el receptor de linfocito B; BCR). En general, las funciones efectoras requieren que la región Fc se combine con un dominio de fijación (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo).

Un "receptor Fc" o "FcR" es un receptor que se fija a la región Fc de una inmunoglobulina. Los FcR que se fijan a un anticuerpo IgG comprenden receptores de la familia FcγR, que incluyen variantes alélicas y, de manera alternativa, formas empalmadas de estos receptores. La familia FcγR consiste en tres receptores activadores (FcγRI, FcγRIII y FcγRIV en ratones; FcγRIA, FcγRIIA y FcγRIIIA en seres humanos) y un receptor inhibidor (FcγRIIB). Las diversas propiedades de FcγR humano se sintetizan en la Tabla 1. La mayoría de los tipos celulares efectoros innatos coexpresan uno o más FcγR activadores y los FcγRIIB inhibidores, mientras que las células *natural killer* (asesina natural) (NK) expresan selectivamente un receptor Fc activador (FcγRIII en ratones y FcγRIIIA en seres humanos), pero no FcγRIIB inhibidor en ratones y humanos. La IgG1 humana se fija a la mayoría de los receptores Fc humanos y se considera que es equivalente a IgG2a murina con respecto a los tipos de receptores Fc activadores a los que se fijan.

Tabla 1. Propiedades de FcγR humano

Fcγ	Variantes alélicas	Afinidad para IgG humana	Preferencia de isotipo	Distribución celular
FcγRI	No descritas	Alta ($K_D \sim 10$ nM)	IgG1=3>4>>2	Monocitos, macrófagos, neutrófilos activados, células dendríticas?
FcγRIIA	H131	Baja a media	IgG1>3>2>4	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, plaquetas
	R131	Baja	IgG1>3>4>2	
FcγRIIA	V158	Media	IgG1=3>>4>2	Células NK, monocitos, macrófagos, mastocitos, eosinófilos, células dendríticas?
	F158	Baja	IgG1=3>>4>2	
FcγRIIB	I232	Baja	IgG1=3=4>2	Linfocitos B, monocitos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos
	T232	Baja	IgG1=3=4>2	

Una "región Fc" (región cristalizable del fragmento) o "dominio Fc" o "Fc" se refiere a la región del terminal C de la cadena pesada de un anticuerpo que media la fijación de la inmunoglobulina para tejidos huésped o factores, que incluyen la fijación a receptores Fc ubicados en diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) o al primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. Por ende, una región Fc comprende la región constante de un anticuerpo que excluye el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante (por ejemplo, CH1 o CL). En los isotipos de los anticuerpos IgG, IgA e IgD, la región Fc comprende dos fragmentos de proteínas idénticos, que derivan del segundo (C_{H2}) y el tercer (C_{H3}) dominio constante de las dos cadenas pesadas del anticuerpo; las regiones Fc de IgM e IgE comprenden tres dominios constantes de la cadena pesada (2-4 dominios C_H) en cada cadena de polipéptidos. Para IgG, la región Fc comprende dominios de inmunoglobulina $C_{\gamma 2}$ y $C_{\gamma 3}$ y la bisagra entre $C_{\gamma 1}$ y $C_{\gamma 2}$. A pesar de que los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina puede variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende, en general, de un residuo de aminoácido en las posiciones C226 o P230 (o aminoácido entre estos dos aminoácidos) hasta el terminal carboxi de la cadena pesada, en donde la numeración se realiza de acuerdo con el índice EU como en Kabat. El dominio C_{H2} de una región Fc de IgG humana se extiende de alrededor del aminoácido 231 a alrededor del aminoácido 340, mientras que el dominio C_{H3} está ubicado en el lado del terminal C de un dominio C_{H2} en una región Fc, es decir, se extiende de alrededor del aminoácido 341 a alrededor del aminoácido 447 de una IgG. Como se usa en la presente, la región

Fc puede ser un Fc de secuencia nativa, que incluye cualquier variante alotípica, o una variante de Fc (por ejemplo, Fc no natural). Fc también se puede referir a esta región en aislamiento o en el contexto de un polipéptido de la proteína que comprende Fc, tal como una "proteína de fijación que comprende una región Fc" también denominada "proteína de fusión Fc" (por ejemplo, un anticuerpo o inmunoadhesina).

Una "región Fc de la secuencia nativa" o "Fc de la secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc natural. Las regiones Fc humanas de la secuencia nativa incluyen una región Fc de IgG1 humana de la secuencia nativa; una región Fc de IgG2 humana de la secuencia nativa; una región Fc de IgG3 humana de la secuencia nativa; y una región Fc de IgG4 humana de la secuencia nativa y las variantes naturales de estas. El Fc de la secuencia nativa incluye los diversos alotipos de Fc (véase, por ejemplo, Jefferies *et al.* (2009) mAbs 1:1).

Una "bisagra", un "dominio bisagra", una "región bisagra" o "una región bisagra del anticuerpo" se refiere al dominio de una región constante de la cadena pesada que une el dominio CH1 al dominio CH2 e incluye las porciones superiores, intermedias e inferiores de la bisagra (Roux *et al.* J. Immunol. 1998 161:4083). La bisagra proporciona diversos niveles de flexibilidad entre las regiones de fijación y efectoras de un anticuerpo y también proporciona sitios para la fijación a disulfuro intermolecular entre dos regiones constantes de la cadena pesada. Como se usa en la presente, una bisagra comienza en Glu216 y termina en Gly237 para todos los isotipos IgG (Roux *et al.*, 1998 J Immunol 161:4083). Las secuencias de bisagras de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de tipo silvestre se muestran en las Tablas 2 y 9.

Tabla 2.
Aminoácidos de la región bisagra

Tipo de Ig	C _H 1* del terminal C	Bisagra superior	Bisagra intermedia	Bisagra inferior
IgG1	VDKRV (SEQ ID NO: 299)	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 301)	CPPCP (SEQ ID NO: 305)	APELLGG (SEQ ID NO: 313)
IgG2	VDKTV (SEQ ID NO: 300)	ERK	CCVECPPCP (SEQ ID NO: 306)	APPVAG (SEQ ID NO: 314)
IgG3 (17-15-15-15)	VDKRV (SEQ ID NO: 299)	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 302)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₃ (SEQ ID NO: 307)	APELLGG (SEQ ID NO: 313)
IgG3 (17-15-15)	VDKRV (SEQ ID NO: 299)	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 302)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₂ (SEQ ID NO: 308)	APELLGG (SEQ ID NO: 313)
IgG3 (17-15)	VDKRV (SEQ ID NO: 299)	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 302)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₁	APELLGG (SEQ ID NO: 313)

IgG3 (15-15-15)	NO: 299) VDKRV (SEQ ID NO: 299)	EPKS (SEQ ID NO: 303)	(SEQ ID NO: 309) CDTPPPCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₂ (SEQ ID NO: 310)	313) APELLGG (SEQ ID NO: 313)
IgG3 (15)	VDKRV (SEQ ID NO: 299)	EPKS (SEQ ID NO: 303)	CDTPPPCPRCP (SEQ ID NO: 311)	APELLGG (SEQ ID NO: 313)
IgG4	VDKRV (SEQ ID NO: 299)	ESKYGPP (SEQ ID NO: 304)	CPSCP (SEQ ID NO: 312)	APEFLGG (SEQ ID NO: 313)

* Secuencias de aminoácidos del terminal C de los dominios CH1.

El término “bisagra” incluye bisagras de tipo silvestre (tal como aquellas establecidas en la Tabla 11), y las variantes de estas (por ejemplo, bisagras no naturales o bisagras modificadas). Por ejemplo, la expresión “bisagra de IgG2” incluye bisagra de IgG2 de tipo silvestre, como se muestra en la Tabla 11, y las variantes que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 y/o, como máximo, 5, 4, 3, 2 o 1 mutaciones, por ejemplo, sustituciones, eliminaciones o adiciones. Los ejemplos de variantes de bisagra de IgG2 incluyen bisagras de IgG2 en donde 1, 2, 3 o todas las 4 cisteínas (C219, C220, C226 y C229) se cambian a otro aminoácido. En una forma de realización específica, una IgG2 comprende una sustitución C219S. En algunas formas de realización, una bisagra es una bisagra híbrida que comprende secuencias de al menos dos isotipos. Por ejemplo, una bisagra puede comprender la bisagra superior, intermedia o inferior de un isotipo y el resto de la bisagra de uno o más isotipos. Por ejemplo, una bisagra puede ser una bisagra de IgG2/IgG1, y puede comprender, por ejemplo, las bisagras superiores e intermedias de IgG2 y la bisagra inferior de IgG1. Una bisagra puede o no tener función efectora. Por ejemplo, la bisagra inferior de IgG1 de tipo silvestre proporciona una función efectora.

La expresión “dominio CH1” se refiere a la región constante de la cadena pesada que une el dominio variable a la bisagra en un dominio constante de la cadena pesada. Como se usa en la presente, un dominio CH1 comienza en A118 y termina en V215. La expresión “dominio CH1” incluye los dominios CH1 de tipo silvestre (tal como los que tienen SEQ ID NO: 278 para IgG1, y SEQ ID NO: 279 para IgG2; Tabla 11), y las variantes de estos (por ejemplo, los dominios CH1 no naturales o los dominios CH1 modificados). Por ejemplo, la expresión “dominio CH1” incluye los dominios CH1 de tipo silvestre y las variantes que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 y/o, como máximo, 5, 4, 3, 2 o 1 mutaciones, por ejemplo, sustituciones, eliminaciones o adiciones. Los ejemplos de dominios CH1 incluyen dominios CH1 con mutaciones que modifican la actividad biológica de un anticuerpo, tal como ADCC, CDC o semivida. En la presente,

se proporcionan las modificaciones al dominio CH1 que afectan una actividad biológica de un anticuerpo.

La expresión “dominio CH2” se refiere a la región constante de la cadena pesada que une la bisagra al dominio CH3 en un dominio constante de la cadena pesada. Como se usa en la presente, un dominio CH2 comienza en P238 y termina en K340. La expresión “dominio CH2” incluye dominios CH2 de tipo silvestre (tales como los que tienen SEQ ID NO: 280 para IgG1, y SEQ ID NO: 297 para IgG2; Tabla 11), y las variantes de estos (por ejemplo, dominios CH2 no naturales o dominio CH2 modificados). Por ejemplo, la expresión “dominio CH2” incluye los dominios CH2 de tipo silvestre y las variantes que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 y/o, como máximo, 5, 4, 3, 2 o 1 mutaciones, por ejemplo, sustituciones, eliminaciones o adiciones. Los ejemplos de dominios CH2 incluyen dominios CH2 con mutaciones que modifican la actividad biológica de un anticuerpo, tal como ADCC, CDC o semivida. En algunas formas de realización, un dominio CH2 comprende las sustituciones A330S/P331S que reducen la función efectora. En la presente, se proporcionan otras modificaciones al dominio CH2 que afectan una actividad biológica de un anticuerpo.

La expresión “dominio CH3” se refiere a la región constante de la cadena pesada que es el terminal C del dominio CH2 en un dominio constante de la cadena pesada. Como se usa en la presente, un dominio CH3 comienza en G341 y termina en K447. La expresión “dominio CH3” incluye dominios CH3 de tipo silvestre (tales como los que tienen SEQ ID NO: 282 para IgG1, y SEQ ID NO: 298 para IgG2; Tabla 11), y las variantes de estos (por ejemplo, dominios CH3 no naturales o dominio CH3 modificados). Por ejemplo, la expresión “dominio CH3” incluye los dominios CH3 de tipo silvestre y las variantes que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 y/o, como máximo, 5, 4, 3, 2 o 1 mutaciones, por ejemplo, sustituciones, eliminaciones o adiciones. Los ejemplos de dominios CH3 incluyen dominios CH3 con mutaciones que modifican la actividad biológica de un anticuerpo, tal como ADCC, CDC o semivida. En la presente, se proporcionan las modificaciones al dominio CH3 que afectan una actividad biológica de un anticuerpo.

Una “región Fc de la secuencia nativa” o “Fc de la secuencia nativa” comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc natural. Las regiones Fc humanas de la secuencia nativa incluyen una región Fc de IgG1 humana de la secuencia nativa; una región Fc de IgG2 humana de la secuencia nativa; una región Fc de IgG3 humana de la secuencia nativa; y una región Fc de IgG4 humana de la secuencia nativa y las

variantes naturales de estas. El Fc de la secuencia nativa incluye los diversos alotipos de Fc (véase, por ejemplo, Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1).

Las expresiones "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno (por ejemplo, GITR) al cual se fijan específicamente una inmunoglobulina o un anticuerpo. Los epítipos se pueden formar de aminoácidos contiguos (en general, un epítipo lineal) o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína (en general, un epítipo conformacional). Los epítipos formados de aminoácidos contiguos se retienen en general, pero no siempre, ante la exposición a solventes de desnaturalización, mientras que los epítipos formados por el plegamiento se pierden, en general, en el tratamiento con los solventes de desnaturalización. Un epítipo incluye, en general, al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación especial única. Los métodos para determinar qué epítipos están unidos por un determinado anticuerpo (es decir, mapeo de epítipos) son conocidos en el estado de la técnica e incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunotransferencia e inmunoprecipitación, en donde los péptidos superpuestos o contiguos (por ejemplo, de GITR) se evalúan para determinar la reactividad con un determinado anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-GITR). Los métodos para determinar la conformación espacial de epítipos incluyen técnicas en el estado de la técnica y aquellas descritas en la presente, por ejemplo, cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear bidimensional y HDX-MS (véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, vol. 66, G. E. Morris, ed. (1996)).

La expresión "mapeo de epítipos" se refiere al proceso de identificación de los determinantes moleculares para el reconocimiento de anticuerpo-antígeno.

La expresión "se fija al mismo epítipo" con referencia a dos o más anticuerpos significa que los anticuerpos se fijan al mismo segmento de residuos de aminoácidos, como se determina mediante un método determinado. Las técnicas para determinar si los anticuerpos se fijan al "mismo epítipo en GITR" con los anticuerpos descritos en la presente incluyen, por ejemplo, métodos de mapeo de epítipos, tales como, análisis de rayos X de cristales de complejos antígeno:anticuerpo que proporcionan resolución atómica del epítipo y espectrometría de masa del intercambio hidrógeno/deuterio (HDX-MS). Otros métodos controlan la fijación del anticuerpo a los fragmentos de antígeno o variaciones mutadas del antígeno donde la pérdida de la fijación debido a una modificación de un residuo de aminoácido dentro de la secuencia de antígenos a menudo se consideran como una indicación de un componente de epítipo. Además,

también se pueden usar los métodos computacionales combinados para el mapeo de epítomos. Estos métodos dependen de la capacidad del anticuerpo de interés de aislar por afinidad péptidos cortos específicos de colecciones de péptidos de expresión de fagos combinados. Se espera que los anticuerpos que tienen la misma VH y VL o las mismas secuencias CDR1, 2 y 3 se fijen al mismo epítomo.

Los anticuerpos que “compiten con otro anticuerpo para la fijación a una diana” se refieren a los anticuerpos que inhiben (parcial o totalmente) la fijación de otro anticuerpo a la diana. Si dos anticuerpos compiten entre sí para la fijación a una diana, es decir, si lo hacen y hasta qué punto un anticuerpo inhibe la fijación de otro anticuerpo a una diana, se puede determinar mediante experimentos de competencia conocidos. En algunas formas de realización, un anticuerpo compite con otro anticuerpo e inhibe la fijación de otro anticuerpo a una diana en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %. El nivel de inhibición o competencia puede ser diferente según qué anticuerpo es el “anticuerpo de bloqueo” (es decir, el anticuerpo frío que se incubaba primero con la diana). Los ensayos de competencia se pueden realizar como se describieron, por ejemplo, en Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harb Protoc ; 2006; doi:10.1101/pdb.prot4277 o en el capítulo 11 de “Using Antibodies” por Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU. 1999. Los anticuerpos de competencia se fijan al mismo epítomo, a un epítomo superpuesto o a epítomos adyacentes (por ejemplo, como se muestra mediante inhibición estérica).

Otros ensayos de fijación competitivos incluyen: radioinmunoensayo (RIA) de fase sólida directos o indirectos, inmunoensayo enzimático (EIA) de fase sólida directo o indirecto, ensayo de competencia tipo sándwich (véase Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); EIA de biotina-avidina de fase sólida directo (véase Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); ensayo etiquetado de fase sólida directo, ensayo tipo sándwich etiquetado de fase sólida directo (véase Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA etiquetado de fase sólida directo usando la etiqueta I-125 (véase Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA de biotina-avidina de fase sólida directo (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); y RIA etiquetado directo. (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)).

Como se usa en la presente, las expresiones “fijación específica”, “fijación selectiva”, “se fija de manera selectiva a” y “se fija específicamente a” se refieren al anticuerpo que se fija a un epítomo en un antígeno predeterminado. En general, el

anticuerpo (i) se fija con una constante de disociación de equilibrio (K_D) de aproximadamente menos de 10^{-7} M, tal como aproximadamente menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o aun menos cuando se determina mediante, por ejemplo, tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento BIACORE 2000 usando el antígeno predeterminado, por ejemplo, GITR humano recombinante, como el analito y el anticuerpo como ligando, o análisis de Scatchard de fijación del anticuerpo a las células positivas del antígeno, y (ii) se fija al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad para la fijación a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) que no es el antígeno predeterminado o un antígeno relacionado estrechamente. En consecuencia, un anticuerpo que “se fija específicamente a GITR humano” se refiere a un anticuerpo que se fija a GITR humano unido a la célula o soluble con una K_D de 10^{-7} M o menos, por ejemplo, aproximadamente menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o aun menos. Un anticuerpo que “tiene reactividad cruzada con GITR de *Macaca fascicularis*” se refiere a un anticuerpo que se fija a GITR de *Macaca fascicularis* con una K_D de 10^{-7} M o menos, por ejemplo, aproximadamente menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o aun menos. En algunas formas de realización, tales anticuerpos que no tienen reactividad cruzada con GITR de una especie no humana exhiben una fijación esencialmente no detectable contra estas proteínas en ensayos de fijación estándares.

Como se usan en la presente, los términos “ k_{asoc} ” o “ k_a ”, se refieren a la constante de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que los términos “ k_{dis} ” o “ k_d ” se refieren a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Como se usa en la presente, el término “ K_D ” se refiere a la constante de disociación que se obtiene de la relación entre k_d y k_a (es decir, k_d/k_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores K_D de los anticuerpos se pueden determinar usando métodos establecidos en el estado de la técnica. Un método preferido para determinar la K_D de un anticuerpo es mediante resonancia de plasmones superficiales, preferentemente, con un sistema biosensor, tal como un sistema Biacore® o una citometría de flujo y análisis de Scatchard.

Como se usa en la presente, la expresión “alta afinidad” para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-8} M o menos, con mayor preferencia, 10^{-9} M o menos, y aun con mayor preferencia, 10^{-10} M o menos para un antígeno diana. Sin embargo, la “alta afinidad” de fijación puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, la “alta afinidad” de fijación para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-7} M o menos, con mayor preferencia, 10^{-8} M o

menos.

El término “EC50” en el contexto de un ensayo *in vitro* o *in vivo* usando un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se refiere a la concentración de un anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, que induce una respuesta que es 50 % de respuesta máxima, es decir, un valor intermedio entre la respuesta máxima y el inicio.

La expresión “se fija a GTR inmovilizado” se refiere a la capacidad de un anticuerpo descrito en la presente de fijarse a GTR, por ejemplo, expresado en la superficie de una célula o que se une a un soporte sólido.

Como se usa en la presente, la expresión “tiene reactividad cruzada” se refiere a la capacidad de un anticuerpo descrito en la presente de fijarse a GTR de una especie diferente. Por ejemplo, un anticuerpo descrito en la presente que se fija a GTR humano también se puede fijar a otras especies de GTR (por ejemplo, GTR de *Macaca fascicularis*). Como se usa en la presente, la reactividad cruzada se puede medir mediante la detección de una reactividad específica con antígeno purificado en ensayos de fijación (por ejemplo, SPR, ELISA) o la fijación a células que expresan fisiológicamente GTR o, de otro modo, la interacción funcional con ellas. Los métodos para determinar la reactividad cruzada incluyen ensayos de fijación estándares como se describe en la presente, por ejemplo, mediante análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR) Biacore™ usando un instrumento Biacore™ 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Suecia), o técnicas citométricas de flujo.

Como se usa en la presente, el término “natural” como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos que está presente en un organismo (incluso virus) que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no se haya modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio es natural.

Un “polipéptido” se refiere a una cadena que comprende al menos dos residuos de aminoácidos ligados consecutivamente, sin límite superior en la longitud de la cadena. Uno o más residuos de aminoácidos en la proteína pueden contener una modificación, tal como, entre otros, glucosilación, fosforilación o formación de puente de disulfuro. Una “proteína” puede comprender uno o más polipéptidos.

Como se usa en la presente, la expresión “molécula de ácido nucleico” pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria y puede ser cADN.

También se proporcionan “modificaciones de secuencias conservadoras” de las

secuencias establecidas en la presente, por ejemplo, en la Tabla 11, tal como en SEQ ID NO: 13-191, es decir, las modificaciones de la secuencia de aminoácidos y nucleótidos no anulan la fijación del anticuerpo codificado por la secuencia de nucleótidos, o que contiene la secuencia de aminoácidos, al antígeno. Tales modificaciones de secuencias conservadoras incluyen sustituciones de aminoácidos y nucleótidos conservadoras y adiciones y eliminaciones de aminoácidos y nucleótidos. Por ejemplo, las modificaciones se pueden introducir en una secuencia en la Tabla 11, por ejemplo, SEQ ID NO: 13-191, mediante técnicas estándares conocidas en el estado de la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras incluyen aquellas en donde el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en el estado de la técnica familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ende, un residuo de aminoácidos no esenciales previsto en un anticuerpo anti-GITR se reemplaza, preferentemente, con otro residuo de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales. Los métodos para identificar sustituciones conservadoras de aminoácidos y nucleótidos que no eliminan la fijación al antígeno son conocidas en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi *et al.* *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); y Burks *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)). De manera alternativa, en otra forma de realización, las mutaciones se pueden introducir de manera aleatoria a lo largo de toda la secuencia que codifica el anticuerpo anti-GITR o una parte de aquella, por ejemplo, mediante mutagénesis de saturación, y los anticuerpos anti-GITR modificados resultantes se pueden analizar para determinar la actividad de fijación.

Para los ácidos nucleicos, la expresión “homología sustancial” indica que dos ácidos nucleicos, o secuencias designadas de estos, cuando se alinean o comparan de manera óptima, son idénticos, con inserciones o eliminaciones de nucleótidos adecuadas, en al menos alrededor de 80 % de los nucleótidos, en general, al menos

alrededor de 90 % a 95 %, y con mayor preferencia, al menos alrededor de 98 % a 99,5 % de los nucleótidos. De manera alternativa, la homología sustancial existe cuando los segmentos se hibridarán, en condiciones de hibridación selectiva, en el complemento de la cadena.

Para los polipéptidos, la expresión “homología sustancial” indica que dos polipéptidos, o secuencias designadas de estos, cuando se alinean o comparan de manera óptima, son idénticos, con inserciones o eliminaciones de aminoácidos adecuadas, en al menos alrededor de 80 % de los aminoácidos, en general, al menos alrededor de 90 % a 95 %, y con mayor preferencia, al menos alrededor de 98 % a 99,5 % de los aminoácidos.

El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = cant. de posiciones idénticas / cant. total de posiciones x 100), teniendo en cuenta la cantidad de espacios y la longitud de cada espacio, datos que deben incorporarse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden lograrse usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitativos que se indican más adelante.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar con el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz NWSgapdna.CMP, un peso de espacio de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos también se puede determinar con el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)) que se incorporó en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuo de peso PAM120, penalidad por longitud de espacio de 12 y penalidad por espacio de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar mediante el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

La secuencia de ácidos nucleicos y proteínas descritas en la presente también puede usarse como una “secuencia incógnita” para llevar a cabo búsquedas en bases de datos públicas, por ejemplo, para identificar secuencias relacionadas. Dichas búsquedas pueden llevarse a cabo con los programas NBLAST y XBLAST (versión

2.0) de Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST pueden llevarse a cabo con el programa NBLAST, calificación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácidos nucleicos descritas en la presente. Las búsquedas de proteínas con BLAST pueden llevarse a cabo con el programa XBLAST, calificación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteínas descritas en la presente. A fin de obtener alineaciones espaciadas para fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros predeterminados de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase www.ncbi.nlm.nih.gov.

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otras proteínas o ácidos nucleicos celulares (por ejemplo, las otras partes del cromosoma), mediante técnicas estándares, que incluyen el tratamiento con SDS/alcalino, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras técnicas conocidas en el estado de la técnica. Véase, F. Ausubel, *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987).

Los ácidos nucleicos, por ejemplo, cADN, pueden ser mutados, de acuerdo con las técnicas estándares para proporcionar secuencias de genes. Para secuencias codificantes, estas mutaciones pueden afectar la secuencia de aminoácidos como se desee. En particular, se contemplan secuencias de ADN sustancialmente homólogas a cambios de las constantes V, D, J nativas o que derivan de estas, y otras secuencias descritas en la presente (en donde "derivar" indica que una secuencia es idéntica o está modificada de otra secuencia).

Como se usa en la presente, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al cual se liga. Un tipo de vector es un "plásmido" que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular al cual se pueden ligar segmentos de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Determinados vectores son capaces de replicarse de manera autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de

replicación bacteriano y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped luego de la introducción en la célula huésped y, de este modo, se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que se ligan operativamente. Estos vectores se denominan en la presente “vectores de expresión recombinante” (o simplemente “vectores de expresión”). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante son, a menudo, en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” se pueden usar de manera indistinta ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, también se incluyen otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus asociado a adeno de replicación defectuosa), que tienen funciones equivalentes.

Como se usa en la presente, la expresión “célula huésped recombinante” (o simplemente “célula huésped”) se refiere a una célula que comprende un ácido nucleico que no está naturalmente presente en la célula, y quizás una célula en la que se introdujo un vector de expresión recombinante. Cabe destacar que los términos se refieren no solo a la célula sujeto particular, sino también a la progenie de esa célula. Dado que se pueden producir ciertas modificaciones en las generaciones posteriores debido a mutaciones o influencias ambientales, es posible que la progenie no sea, de hecho, idéntica a la célula de origen, pero aun así está incluida en el alcance de la expresión “célula huésped” que se usa en la presente.

Como se usa en la presente, el término “antígeno” se refiere a cualquier sustancia inmunogénica sintética o natural, tal como una proteína, un péptido o un hapteno. Un antígeno puede ser GITR o un fragmento de este. Un antígeno también puede ser un antígeno tumoral, contra el cual se prefieren respuestas inmunitarias protectoras o terapéuticas, por ejemplo, antígenos expresados por una célula tumoral (por ejemplo, en una vacuna en combinación con un anticuerpo anti-GITR). Los antígenos incluyen antígenos asociados a tumores para la prevención o el tratamiento de tipos de cáncer. Los ejemplos de antígenos asociados a tumores incluyen, entre otros, secuencias que comprenden todas las secuencias de β hCG, gp100 o Pmel17, HER2/neu, WT1, mesotelina, CEA, gp100, MART1, TRP-2, melan-A, NY-ESO-1, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), idiotipo, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-A3, tirosinasa, telomerasa y antígenos SSX2 y MUC-1 o una parte de aquellas, y los antígenos tumorales derivados de la célula germinal. Los antígenos asociados a tumores también

incluyen los antígenos del grupo sanguíneo, por ejemplo, antígenos Le^a, Le^b, LeX, LeY, H-2, B-1, B-2. De manera alternativa, más de un antígeno se puede incluir en un constructo. Por ejemplo, un antígeno MAGE se puede combinar con otros antígenos, tales como melanina A, tirosinasa y gp100, junto con adyuvantes, tales como GM-CSF o IL-12, y se puede ligar a un anticuerpo anti-APC.

Las secuencias de los antígenos anteriores son conocidas en el estado de la técnica. Por ejemplo, un ejemplo de una secuencia de cADN de MAGE-3 se proporciona en US 6.235.525 (Ludwig Institute for Cancer Research); los ejemplos de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de NY-ESO-1 se proporcionan en US 5.804.381 y US 6.069.233 (Ludwig Institute for Cancer Research); los ejemplos de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de Melan-A se proporcionan en US 5.620.886 y US 5.854.203 (Ludwig Institute for Cancer Research); los ejemplos de ácidos nucleicos y proteínas de NY-BR-1 se proporcionan en US 6.774.226 y US 6.911.529 (Ludwig Institute for Cancer Research) y los ejemplos de ácidos nucleicos de NY-CO-58 y proteínas se proporcionan en WO 02090986 (Ludwig Institute for Cancer Research); un ejemplo de una secuencia de aminoácidos para la proteína HER-2/neu está disponible en GENBANK® N.º de acceso AAA58637; y una secuencia de nucleótidos (mRNA) para el antígeno carcinoembrionario humano tipo 1 (CEA-1) está disponible en GENBANK® N.º de acceso NM020219.

Una “respuesta inmunitaria” se refiere a una respuesta biológica dentro de un vertebrado contra agentes exógenos, cuya respuesta protege el organismo contra estos agentes y enfermedades causados por ellos. Una respuesta inmunitaria está mediada por la acción de una célula del sistema inmunitario (por ejemplo, un linfocito T, linfocito B, células *natural killer* (NK), macrófagos, eosinófilos, mastocitos, células dendríticas o neutrófilos) y macromoléculas solubles producidas por cualquiera de estas células o el hígado (que incluye anticuerpos, citocinas y complementos) que producen direccionamiento selectivo, fijación, daños, destrucción y/o eliminación del cuerpo del vertebrado de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas u otras células anormales, o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales. Una reacción inmunitaria incluye, por ejemplo, la activación o inhibición de un linfocito T, por ejemplo, un linfocito T efector o un linfocito Th, tal como un linfocito T CD4+ o CD8+ T, o la inhibición de un linfocito Treg.

Un “inmunomodulador” o “inmunorregulador” se refiere a un agente, por ejemplo, un componente de una vía de señalización, que puede incluir modular,

regular o modificar una respuesta inmunitaria. “Modular”, “regular” o “modificar” una respuesta inmunitaria se refiere a cualquier alteración en una célula del sistema inmunitario o en la actividad de esa célula (por ejemplo, un linfocito T efector). La modulación incluye la estimulación o la supresión del sistema inmunitario que se puede manifestar mediante un aumento o una disminución en la cantidad de diversos tipos celulares, un aumento o una disminución en la actividad de estas células, o cualquier otro cambio que pueda ocurrir dentro del sistema inmunitario. Los inmunomoduladores inhibidores y estimuladores se identificaron, algunos de los cuales pueden tener una función mejorada en un microentorno tumoral. En formas de realización preferidas, el inmunomodulador se ubica en la superficie de un linfocito T. Una “diana inmunomoduladora” o “diana inmunorreguladora” es un inmunomodulador que se dirige para la fijación a una sustancia, un agente, una porción, un compuesto o una molécula, y cuya actividad se altera mediante la fijación de estos. Las dianas inmunomoduladoras incluyen, por ejemplo, receptores en la superficie de una célula (“receptores inmunomoduladores”) y ligandos receptores (“ligandos inmunomoduladores”).

“Inmunoterapia” se refiere al tratamiento de un sujeto que sufre de una enfermedad, o se encuentra en riesgo de contraer o sufrir una recurrencia de aquella, mediante un método que comprende inducir, mejorar, suprimir o, de otro modo, modificar una respuesta inmunitaria.

“Terapia inmunoestimulante” o “terapia inmunoestimuladora” se refiere a una terapia que aumenta (induce o mejora) una respuesta inmunitaria en un sujeto para, por ejemplo, tratar el cáncer.

“Potenciar una respuesta inmunitaria endógena” significa aumentar la eficacia o la potencia de una respuesta inmunitaria existente en un sujeto. Este aumento en la eficacia y la potencia se puede alcanzar, por ejemplo, debilitando los mecanismos que suprimen la respuesta inmunitaria del huésped endógeno o estimulando los mecanismos que mejoran la respuesta inmunitaria del huésped endógeno.

“Linfocitos T efectores” (T_{eff}) se refiere a linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD4+ y CD8+) con actividades citolíticas y linfocitos T colaboradores (Th) que secretan citocinas y activan y dirigen otras células inmunitarias, pero no incluye linfocitos T reguladores (linfocitos Treg). Los anticuerpos anti-GITR descritos en la presente activan linfocitos T_{eff} , por ejemplo, linfocitos T_{eff} CD4+ y CD8+.

Una mayor capacidad para estimular una respuesta inmunitaria o el sistema inmunitario puede deberse a una mejor actividad agonista de los receptores

coestimuladores de linfocitos T y/o una mejor actividad antagonista de los receptores inhibidores. Una mayor capacidad para estimular una respuesta inmunitaria o el sistema inmunitario se puede reflejar mediante un aumento en múltiplos de EC_{50} o el nivel máximo de actividad en un ensayo que mide una respuesta inmunitaria, por ejemplo, un ensayo que mide cambios en la liberación de citocina o quimiocina, la actividad citolítica (determinada directamente en células diana o indirectamente mediante la detección de CD107a o granzimas) y la proliferación. La capacidad de estimular una respuesta inmunitaria o la actividad del sistema inmunitario se puede mejorar en al menos 10 %, 30 %, 50 %, 75 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces o más.

En algunas formas de realización, un anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada modificada tiene una actividad agonista más potente, con respecto al mismo anticuerpo que no comprende una región constante de la cadena pesada modificada. La actividad agonista mejorada de un anticuerpo se puede determinar, por ejemplo, como se muestra en los ejemplos, por ejemplo, midiendo el nivel de la secreción de IFN- γ o IL-2 de los linfocitos T que entran en contacto con el anticuerpo. La actividad agonista se puede mejorar en al menos 10 %, 30 %, 50 %, 75 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces o más, como se definió, mediante mayor liberación de citocina o mayor proliferación en linfocitos T efectores; menor actividad de linfocitos T reguladores si el acoplamiento en Treg reduce la función de Treg; o mayor reducción de Treg. Por ejemplo, la cantidad de IFN- γ o IL-2 secretada de los linfocitos T estimulados con un anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada modificada puede ser al menos 10 %, 30 %, 50 %, 75 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces o más de linfocitos T estimulados con el mismo anticuerpo que no comprende una región constante de la cadena pesada modificada.

Como se usa en la presente, el término "ligado" se refiere a la asociación de dos o más moléculas. La ligadura puede ser covalente o no covalente. La ligadura también puede ser genética (es decir, fusionada de manera recombinante). Las ligaduras se pueden alcanzar usando una amplia variedad de técnicas reconocidas en el estado de la técnica, tales como conjugación química y producción de proteínas recombinantes.

Como se usa en la presente, "administrar" se refiere a la introducción física de una composición que comprende un agente terapéutico a un sujeto, usando cualquiera de los diversos métodos y sistemas de administración conocidos por las personas del oficio de nivel medio. Las vías de administración preferidas para los anticuerpos descritos en la presente incluyen las vías de administración intravenosa,

intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenterales, por ejemplo, por inyección o infusión. La expresión “administración parenteral”, como se usa en la presente, significa modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, por lo general, mediante inyección, e incluye, entre otras, la infusión y la inyección intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intratecal, intralinfática, intralesional, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal, y electroporación *in vivo*. De manera alternativa, un anticuerpo descrito en la presente se puede administrar a través de una vía no parenteral, tal como la vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica. La administración también se puede realizar, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces, y/o durante uno o más períodos extendidos.

Como se usa en la presente, la expresión “respuesta mediada por linfocitos T” se refiere a una respuesta mediada por linfocitos T, que incluyen linfocitos T efectores (por ejemplo, linfocitos CD8⁺) y linfocitos T colaboradores (por ejemplo, linfocitos CD4⁺). Las respuestas mediadas por linfocitos T incluyen, por ejemplo, citotoxicidad y proliferación de linfocitos T.

Como se usa en la presente, la expresión “respuesta de linfocito T citotóxico (CTL)” se refiere a una respuesta inmunitaria inducida por linfocitos T citotóxicos. Las respuestas de CTL están mediadas, en primer lugar, por linfocitos T CD8⁺.

Como se usa en la presente, los términos “inhibir” o “bloquear” (por ejemplo, en referencia a la inhibición/el bloqueo de la fijación de GITR-L a GITR en células) se usan de manera indistinta y abarcan la inhibición/el bloqueo parcial y completo. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-GITR inhibe la fijación de GITR-L a GITR en al menos alrededor de 50 %, por ejemplo, alrededor de 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 %, determinada, por ejemplo, como también se describe en la presente. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-GITR inhibe la fijación de GITR-L a GITR en no más de 50 %, por ejemplo, en alrededor de 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o 1 %, determinada, por ejemplo, como también se describe en la presente.

Como se usa en la presente, la expresión “inhibir el crecimiento” de un tumor incluye cualquier reducción medible en el crecimiento de un tumor, por ejemplo, la inhibición del crecimiento de un tumor en al menos alrededor de 10 %, por ejemplo, al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, o al menos alrededor de 95 %, determinada, por ejemplo, como también se describe en la presente.

al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 99 % o 100 %.

Como se usa en la presente, "cáncer" se refiere a un grupo amplio de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de células anormales en el cuerpo. La división celular desregulada puede generar la formación de tumores o células malignos que invaden los tejidos vecinos y puede hacer metástasis a partes distantes del cuerpo a través del sistema linfático o flujo sanguíneo.

Como se usa en la presente, los términos "tratar," "que trata" y "tratamiento" se refieren a cualquier tipo de intervención o proceso realizado en el sujeto, o la administración de un agente activo a este, con el fin de revertir, aliviar, mejorar, inhibir o enlentecer o prevenir la progresión, el desarrollo, la gravedad o la recurrencia de un síntoma, una complicación, una condición o indicios bioquímicos asociados con una enfermedad. El tratamiento puede ser el de un sujeto que tiene una enfermedad o un sujeto que no tiene una enfermedad (por ejemplo, para la profilaxis).

Un "cáncer hematológico" incluye un linfoma, leucemia, mieloma o un cáncer linfoide y un cáncer de bazo y de ganglios linfáticos. Los ejemplos de linfomas incluyen linfomas de linfocitos B (un cáncer hematológico de linfocitos B) y linfomas de linfocitos T. Los linfomas de linfocitos B incluyen linfomas de Hodgkin y la mayoría de linfomas de no Hodgkin. Los ejemplos no limitativos de linfomas de linfocitos B incluyen linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas, linfoma linfocítico de células pequeñas (se superpone con la leucemia linfocítica crónica), linfoma de células del manto (MCL), linfoma de Burkitt, linfoma mediastínico de linfocitos B grandes, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma nodular de linfocitos B de la zona marginal, linfoma esplénico de la zona marginal, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, linfoma de efusión primaria, granulomatosis linfomatoide. Los ejemplos no limitativos de linfomas de linfocitos T incluyen linfoma extranodular de linfocitos T, linfoma cutáneo de linfocitos T, linfoma anaplásico de células grandes y linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T. Los tipos de cáncer hematológicos también incluyen leucemia, tales como, entre otras, leucemia secundaria, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica y leucemia linfoblástica aguda. Los tipos de cáncer hematológicos también incluyen mielomas, tales como, entre otros, mieloma múltiple y mieloma múltiple quiescente. Otros tipos de cáncer hematológicos y/o asociados a linfocitos B o linfocitos T están incluidos en la expresión cáncer hematológico.

Las expresiones “dosis eficaz” o “dosificación eficaz” se definen como una cantidad suficiente para alcanzar o al menos parcialmente alcanzar un efecto deseado. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "una dosis terapéuticamente eficaz" de un fármaco o agente terapéutico es cualquier cantidad de fármaco que, cuando se usa solo o en combinación con otro agente terapéutico, promueve la regresión de la enfermedad que se manifiesta mediante una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia y duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad, o la prevención de disfunciones o discapacidades causadas por la enfermedad. Una cantidad o una dosis terapéuticamente eficaz de un fármaco incluye una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "dosis profilácticamente eficaz", que es cualquier cantidad de fármaco que, cuando se administra solo o en combinación con otro agente terapéutico a un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad o sufrir una recurrencia de la enfermedad, inhibe el desarrollo o recurrencia de la enfermedad. La capacidad de un agente terapéutico de promover la regresión de la enfermedad o inhibir el desarrollo o la recurrencia de la enfermedad se puede evaluar usando varios métodos conocidos por la persona del oficio de nivel medio, tales como en sujetos humanos durante los ensayos clínicos, en sistemas de modelo de animales predictivos de la eficacia en humanos, o mediante el análisis de la actividad del agente en ensayos *in vitro*.

A modo de ejemplo, un agente contra el cáncer es un fármaco que promueve la regresión del cáncer en un sujeto. En formas de realización preferidas, una cantidad terapéuticamente eficaz de fármaco promueve la regresión del cáncer al punto de eliminar el cáncer. "Promover la regresión del cáncer" significa que administrar una cantidad eficaz de fármaco, solo o en combinación con un agente antineoplásico, produce una reducción en el crecimiento tumoral o el tamaño del tumor, la necrosis del tumor, una disminución de la gravedad de al menos un síntoma de la enfermedad, un aumento de la frecuencia y duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad, la prevención de disfunciones o discapacidad causadas por la enfermedad, o de otro modo, la mejora de los síntomas de la enfermedad en el paciente. Además, los términos "eficaz" y "eficacia" con respecto al tratamiento incluyen la eficacia farmacológica y la seguridad fisiológica. La eficacia farmacológica se refiere a la capacidad del fármaco para promover la regresión del cáncer en el paciente. La seguridad fisiológica se refiere al nivel de toxicidad, u otros efectos fisiológicos adversos a nivel celular, orgánico y/o del organismo (efectos adversos) que resultan de la administración del fármaco.

A modo de ejemplo, para el tratamiento de tumores, una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco inhibe, preferentemente, el crecimiento celular o tumoral en al menos alrededor de 20 %, con mayor preferencia, al menos alrededor de 40 %, aun con mayor preferencia, al menos alrededor de 60 % y, aun con mayor preferencia, al menos alrededor de 80 % con respecto a los sujetos sin tratar. En las formas de realización de máxima preferencia, una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco inhibe totalmente el crecimiento celular o tumoral, es decir, inhibe, preferentemente, el crecimiento celular o tumoral en 100 %. La capacidad de un compuesto de inhibir el crecimiento tumoral se puede evaluar usando los ensayos descritos a continuación. De manera alternativa, esta propiedad de una composición se puede evaluar analizando la capacidad del compuesto de inhibir el crecimiento celular, tal inhibición se puede medir *in vitro*, mediante ensayos conocidos por las personas del oficio de nivel medio. En otras formas de realización preferidas descritas en la presente, la regresión tumoral se puede observar y puede continuar durante un período de al menos 20 días, con mayor preferencia, al menos alrededor de 40 días, o aun con mayor preferencia, al menos alrededor de 60 días.

El término “paciente” incluye sujetos humanos y otros sujetos mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

Como se usa en la presente, el término “sujeto” incluye cualquier ser humano o un animal no humano. Por ejemplo, los métodos y las composiciones descritas en la presente se pueden usar para tratar un sujeto que tiene cáncer. La expresión “animal no humano” incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Como se usa en la presente, los términos “ug” y “uM” se usan de manera indistinta con “μg” y “μM”.

Varios aspectos descritos en la presente se describen en mayor detalle en las siguientes subsecciones.

I. Anticuerpos anti-GITR

Se describen en la presente anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos totalmente humanos, que se caracterizan mediante características y propiedades funcionales particulares. Por ejemplo, los anticuerpos se fijan específicamente a GITR humano. De manera adicional, los anticuerpos tienen reactividad cruzada con GITR de uno o más primates no humanos, tales como GITR de *Macaca fascicularis*.

Además de fijarse específicamente a GITR humano soluble y/o unido a la

membrana, los anticuerpos descritos en la presente exhiben una o más de las siguientes propiedades funcionales:

- (a) se fijan a GITR de *Macaca fascicularis*;
- (b) estimulan o mejoran una respuesta inmunitaria;
- (c) activan linfocitos T (como se muestra, por ejemplo, mediante la secreción de citocina y/o la proliferación mejoradas);
- (d) inhiben la fijación de GITRL a GITR en células 3A9-hGITR;
- (e) inhiben parcialmente, como máximo, la fijación del ligando GITR a GITR en linfocitos T activados;
- (f) se fijan a un epítipo conformacional en la porción del terminal N de GITR humano;
- (g) se fijan a GITR humano glucosilado y no glucosilado; y
- (h) tienen actividad agonista en ausencia de la fijación de un receptor Fc, pero en donde la fijación a un receptor Fc también mejora la actividad agonista.

Preferentemente, los anticuerpos anti-GITR se fijan a GITR con alta afinidad, por ejemplo, con una K_D de 10^{-7} M o menos, 10^{-8} M o menos, 10^{-9} M o menos, 10^{-10} M o menos, 10^{-11} M o menos, 10^{-12} M o menos, 10^{-12} M a 10^{-7} M, 10^{-11} M a 10^{-7} M, 10^{-10} M a 10^{-7} M o 10^{-9} M a 10^{-7} M. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR se fija a GITR humano soluble, por ejemplo, como se determinó mediante Biacore, con una K_D de 10^{-7} M o menos, 10^{-8} M o menos, 10^{-9} M (1 nM) o menos, 10^{-10} M o menos, 10^{-12} M a 10^{-7} M, 10^{-11} M a 10^{-7} M, 10^{-10} M a 10^{-7} M, 10^{-9} M a 10^{-7} M o 10^{-8} M a 10^{-7} M. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR se fija a GITR humano unido (por ejemplo, unido a la membrana celular), tal como linfocitos T humanos activados, por ejemplo, como se determinó mediante citometría de flujo y representación de Scatchard, con una K_D de 10^{-7} M o menos, 10^{-8} M o menos, 10^{-9} M (1 nM) o menos, 10^{-10} M o menos, 10^{-12} M a 10^{-7} M, 10^{-11} M a 10^{-8} M, 10^{-10} M a 10^{-8} M, 10^{-9} M a 10^{-8} M, 10^{-11} M a 10^{-9} M o 10^{-10} M a 10^{-9} M. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR se fija a GITR humano unido (por ejemplo, unido a la membrana celular), tal como linfocitos T humanos activados, por ejemplo, como se determinó mediante FACS, con un EC_{50} de 10^{-7} M o menos, 10^{-8} M o menos, 10^{-9} M (1 nM) o menos, 10^{-10} M o menos, 10^{-12} M a 10^{-7} M, 10^{-11} M a 10^{-8} M, 10^{-10} M a 10^{-8} M, 10^{-9} M a 10^{-8} M, 10^{-11} M a 10^{-9} M o 10^{-10} M a 10^{-9} M. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR se fija a GITR humano soluble con una K_D de 10^{-7} M o menos, 10^{-8} M o menos, 10^{-9} M (1 nM) o menos, 10^{-10} M o menos, 10^{-12} M a 10^{-7} M, 10^{-11} M a 10^{-7} M, 10^{-10} M a 10^{-7} M, 10^{-9} M a 10^{-7} M o 10^{-8} M a 10^{-7} M, y a GITR humano unido a la

membrana celular con una K_D o EC_{50} de 10^{-7} M o menos, 10^{-8} M o menos, 10^{-9} M (1 nM) o menos, 10^{-10} M o menos, 10^{-12} M a 10^{-7} M, 10^{-11} M a 10^{-8} M, 10^{-10} M a 10^{-8} M, 10^{-9} M a 10^{-8} M, 10^{-11} M a 10^{-9} M o 10^{-10} M a 10^{-9} M.

Los anticuerpos anti-GITR se pueden fijar a GITR de *Macaca fascicularis*, por ejemplo, a GITR de *Macaca fascicularis* unido a la membrana, por ejemplo, con un EC_{50} de 100 nM o menos, 10 nM o menos, 100 nM a 0,01 nM, 100 nM a 0,1 nM, 100 nM a 1 nM o 10 nM a 1 nM, por ejemplo, como se midió mediante FACS (por ejemplo, como se describe en los ejemplos).

Los anticuerpos anti-GITR pueden estimular o mejorar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, activando linfocitos T_{eff} , limitando la supresión de linfocitos T efectores mediante linfocitos Treg, reduciendo y/o inhibiendo linfocitos Treg tumorales y/o activando células NK, por ejemplo, en el tumor. Por ejemplo, los anticuerpos anti-GITR pueden activar o coestimular los linfocitos T_{eff} como se muestra, por ejemplo, mediante secreción mejorada de citocina (por ejemplo, IL-2 e IFN- γ) y/o proliferación mejorada. En algunas formas de realización, se proporciona estimulación de CD3. En algunas formas de realización, un anticuerpo GITR aumenta la secreción de IL-2 por un factor de 50 %, 100 % (es decir, 2 veces), 3 veces, 4 veces, 5 veces o más, opcionalmente con un máximo de hasta 10 veces, 30 veces, 100 veces, como se midió, por ejemplo, en linfocitos T humanos primarios o linfocitos T que expresan GITR humano (por ejemplo, como también se describe en los ejemplos). En algunas formas de realización, un anticuerpo GITR aumenta la secreción de IFN- γ por un factor de 50 %, 100 % (es decir, 2 veces), 3 veces, 4 veces, 5 veces o más, opcionalmente con un máximo de hasta 10 veces, 30 veces, 100 veces, como se midió, por ejemplo, en linfocitos T humanos primarios o linfocitos T que expresan GITR humano (por ejemplo, como también se describe en los ejemplos).

Los anticuerpos anti-GITR pueden inhibir la fijación de GITRL humano a GITR humano en células, por ejemplo, células 3A9 que expresan GITR humano, por ejemplo, con un EC_{50} de 10 μ g/ml o menos, 1 μ g/ml o menos, 0,01 μ g/ml a 10 μ g/ml, 0,1 μ g/ml a 10 μ g/ml o 0,1 μ g/ml a 1 μ g/ml (véase el Ejemplo 5).

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR, como máximo, solo inhiben parcialmente la fijación de GITRL humano a GITR humano en células, por ejemplo, linfocitos T activados (véase el Ejemplo 5).

Los anticuerpos Anti-GITR se pueden fijar a un epítipo, por ejemplo, un epítipo conformacional en la porción del terminal N de GITR humano, por ejemplo, un epítipo ubicado entre los aminoácidos 1 a 39 de GITR humano maduro (véase el

Ejemplo 9), como se determinó, por ejemplo, mediante la fijación de los anticuerpos a fragmentos de GITR humano, por ejemplo, fragmentos nativos (es decir, no desnaturalizados) de GITR humano. Los anticuerpos anti-GITR se pueden fijar a los aminoácidos 1 a 20 de GITR humano maduro, o a un epítipo ubicado en aquellos, como se determinó, por ejemplo, mediante la fijación de los anticuerpos a los fragmentos de GITR humano, por ejemplo, fragmentos nativos (es decir, no desnaturalizados) de GITR humano, y luego mediante escisión enzimática o mediante HDX (véanse los Ejemplos 11 y 12, respectivamente). Los anticuerpos anti-GITR se pueden fijar a aminoácidos 3 a 20 de GITR humano maduro, o a un epítipo en aquellos, (PTGGPGCGPGRLLLGTGT, SEQ ID NO: 217). Los anticuerpos anti-GITR se pueden fijar a los aminoácidos 3 a 20 y a los aminoácidos 33 a 40 de GITR humano maduro, o a un epítipo en aquellos, es decir, secuencias de aminoácidos PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) y CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218). En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR se fijan a GITR humano glucosilado y no glucosilado. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR se fijan a las secuencias de aminoácidos PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) y CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218), como se determinó mediante HDX, por ejemplo, usando el protocolo establecido en los ejemplos.

Los anticuerpos anti-GITR pueden competir para la fijación a GITR con (o inhibir la fijación de) los anticuerpos anti-GITR que comprenden CDR o regiones variables descritas en la presente, por ejemplo, 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10, y/o 6G10. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR inhiben la fijación de 28F3, 3C3, 2G6, 8A6, 9G7, 14E3, 19H8, 19D3, 18E10 y/o 6G10 a GITR humano en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. En algunas formas de realización, 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 y/o 6G10 inhiben la fijación de los anticuerpos anti-GITR a GITR humano en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR inhiben la fijación de 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 y/o 6G10 a GITR humano en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% y 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 y/o 6G10 inhibe la fijación de los anticuerpos anti-GITR a GITR humano en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% (por ejemplo, compite en ambas direcciones).

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR inducen o mejoran la activación de linfocitos T sin requerir reticulación multivalente, como se determinó, por ejemplo, por la falta de fijación a FcR. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR son multivalentes, por ejemplo, bivalentes. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR no son monovalentes. Se mostró en la presente que los fragmentos F'(ab)₂ son más eficaces que los fragmentos Fab en la activación de linfocitos T (véanse los ejemplos).

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR no necesitan reticulación a través de receptores Fc para su actividad agonista, sin embargo, la reticulación de los receptores Fc mejora su actividad agonista con respecto al mismo anticuerpo que no se fija a los receptores Fc.

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 de las siguientes características:

(1) se fijan a GITR humano soluble, por ejemplo, con una K_D de 10 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se midió mediante Biacore;

(2) se fijan a GITR humano unido a la membrana, por ejemplo, con una K_D de 1 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 1 nM), por ejemplo, como se midió mediante Scatchard;

(3) se fijan a GITR humano unido a la membrana, por ejemplo, con un EC₅₀ de 1 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 1 nM), por ejemplo, como se midió mediante FACS;

(4) se fijan a GITR de *Macaca fascicularis*, por ejemplo, se fija a GITR de *Macaca fascicularis* unido a la membrana, por ejemplo, con EC₅₀ de 10 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 10 nM), como se midió mediante FACS;

(5) inducen o mejoran la activación de linfocitos T, tal como en presencia del acoplamiento CD3 (por ejemplo, en presencia de concentraciones anti-CD3 subóptimas), como se demostró mediante (i) el aumento de la producción de IL-2 y/o IFN-γ en linfocitos T que expresan GITR y/o (ii) la mejora en la proliferación de linfocitos T;

(6) inducen o mejoran la activación de linfocitos T sin requerir la reticulación multivalente;

(7) tienen actividad agonista en ausencia de la fijación a un receptor Fc, pero en donde la fijación a un receptor Fc también mejora la actividad agonista;

(8) inhiben la fijación del ligando GITR a GITR, por ejemplo, con EC₅₀

de 1 µg/ml o menos, según se mide mediante FACS, por ejemplo, en un ensayo con células 3A9-hGITR;

(9) inhiben parcialmente, como máximo, la fijación del ligando GITR a GITR en linfocitos T activados;

(10) se fijan a un epítipo conformacional en GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4), por ejemplo, un epítipo discontinuo en las secuencias de aminoácidos PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) y CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218);

(11) se fijan a GITR humano glucosilado y no glucosilado ligado a O y ligado a N; y

(12) compiten en cualquier dirección o en ambas direcciones para la fijación de GITR humano con 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 y/o 6G10.

Los anticuerpos anti-GITR también pueden inducir la internalización de GITR en linfocitos T activados, por ejemplo, linfocitos T CD4+ y CD8+, por ejemplo, durante 10, 30 o 60 minutos, y la posterior transducción de señales, por ejemplo, activación (es decir, fosforilación) de p65 NF-κB y p38 MAPQuinasa.

En consecuencia, un anticuerpo que exhibe una o más de estas propiedades funcionales (por ejemplo, bioquímicas, inmunoquímicas, celulares, fisiológicas u otras actividades biológicas, o similares) como se determinó de acuerdo con las metodologías conocidas en el estado de la técnica y descritas en la presente, se relacionará con una diferencia estadísticamente significativa en la actividad particular con respecto a aquella presente en ausencia del anticuerpo (por ejemplo, o cuando un anticuerpo de control de especificidad irrelevante se encuentra presente). Preferentemente, los aumentos inducidos por anticuerpos anti-GITR en un parámetro medible (por ejemplo, proliferación de linfocitos T, producción de citocina) producen un aumento estadísticamente significativo en al menos 10 % del parámetro medible, con mayor preferencia, en al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% (es decir, 2 veces), 3 veces, 5 veces o 10 veces, y en algunas formas de realización preferidas, un anticuerpo descrito en la presente puede aumentar el parámetro medible en más de 92%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99%, 100% (es decir, 2 veces), 3 veces, 5 veces o 10 veces. Por el contrario, las disminuciones inducidas por anticuerpos anti-GITR en un parámetro medible (por ejemplo, volumen tumoral, fijación de GITR-L a GITR, cantidad de linfocitos T reguladores en tumores) producen una disminución estadísticamente significativa en al menos 10% del parámetro medible,

con mayor preferencia, en al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%, y, en algunas formas de realización, un anticuerpo descrito en la presente puede disminuir el parámetro medible en más de 92%, 94%, 95%, 97%, 98% o 99%.

Los ensayos estándares para evaluar la capacidad de fijación de los anticuerpos a GITR de diversas especies son conocidos en el estado de la técnica, que incluyen, por ejemplo, ELISA, transferencia Western y RIA. Los ensayos adecuados se describen en detalle en los ejemplos. La cinética de fijación (por ejemplo, afinidad de fijación) de los anticuerpos también se puede evaluar mediante ensayos estándares conocidos en el estado de la técnica, tales como mediante análisis Biacore. Los ensayos para evaluar los efectos de los anticuerpos en propiedades funcionales de GITR (por ejemplo, fijación al ligando, proliferación de linfocitos T, producción de citocina) se describen en mayor detalle a continuación y en los ejemplos.

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR no son anticuerpos nativos o no son anticuerpos naturales. Por ejemplo, los anticuerpos anti-GITR tienen modificaciones posteriores a la traducción que son diferentes de aquellos anticuerpos que son naturales, tales como tener más, menos o un tipo diferentes de modificación posterior a la traducción.

II. Ejemplos de anticuerpos anti-GITR

Los anticuerpos particulares descritos en la presente son anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, que tienen las secuencias CDR y/o de la región variable de anticuerpos 28F3, 19D3, 18E10, 3C3, 2G6, 8A6, 9G7, 14E3, 19H8 y 6G10, aislados y estructuralmente caracterizados como se describe en el Ejemplo 1, y los anticuerpos que tienen al menos 80% de identidad (por ejemplo, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99% de identidad) a sus secuencias de la región variable o CDR. Las secuencias de aminoácidos de V_H de 28F3, 19D3, 18E10, 3C3 (3C3-1 y 3C3-2), 2G6, 8A6, 9G7 (9G7-1 y 9G7-2), 14E3, 19H8 (19H8-1 y 19H8-2) y 6G10 se indican en SEQ ID NO: 13, 26, 39, 52, 71, 84, 97, 115, 128 y 335, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de V_L de 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 y 6G10 se muestran en SEQ ID NO: 14, 27, 40, 53, 54, 72, 85, 98, 99, 116, 129, 130 y 336, respectivamente.

En consecuencia, se proporcionan en la presente anticuerpos aislados, o una porción de fijación al antígeno de estos, que comprenden regiones variables de la cadena liviana y pesada, en donde la región variable de la cadena pesada comprende

una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, 26, 39, 52, 71, 84, 97, 115, 128 y 335.

También se proporcionan anticuerpos aislados, o porciones de fijación al antígeno de estos, que comprenden regiones variables de la cadena liviana y pesada, en donde la región variable de la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, 27, 40, 53, 54, 72, 85, 98, 99, 116, 129, 130 y 336.

Se proporcionan en la presente anticuerpos aislados, o una porción de fijación al antígeno de estos, que comprenden:

(a) secuencias de las regiones variables de la cadena liviana y pesada que comprenden SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente;

(b) secuencias de las regiones variables de la cadena liviana y pesada que comprenden SEQ ID NO: 26 y 27, respectivamente;

(c) secuencias de las regiones variables de la cadena liviana y pesada que comprenden SEQ ID NO: 39 y 40, respectivamente;

(d) secuencias de las regiones variables de la cadena liviana y pesada que comprenden SEQ ID NO: 52 y 53, respectivamente;

(e) secuencias de las regiones variables de la cadena liviana y pesada que comprenden SEQ ID NO: 52 y 54, respectivamente;

(f) secuencias de las regiones variables de la cadena liviana y pesada que comprenden SEQ ID NO: 71 y 72, respectivamente;

(g) secuencias de las regiones variables de la cadena liviana y pesada que comprenden SEQ ID NO: 84 y 85, respectivamente;

(h) secuencias de las regiones variables de la cadena liviana y pesada que comprenden SEQ ID NO: 97 y 98, respectivamente;

(i) secuencias de las regiones variables de la cadena liviana y pesada que comprenden SEQ ID NO: 97 y 99, respectivamente;

(j) secuencias de las regiones variables de la cadena liviana y pesada que comprenden SEQ ID NO: 115 y 116, respectivamente;

(k) secuencias de las regiones variables de la cadena liviana y pesada que comprenden SEQ ID NO: 128 y 129, respectivamente;

(l) secuencias de las regiones variables de la cadena liviana y pesada que comprenden SEQ ID NO: 128 y 130, respectivamente; o

(m) secuencias de las regiones variables de la cadena liviana y pesada que comprenden SEQ ID NO: 335 y 336, respectivamente.

Los anticuerpos anti-GITR pueden comprender CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana y pesada de 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 y 6G10, o combinaciones de estos. Las secuencias de aminoácidos de CDR1 de V_H de 28F3, 19D3, 18E10, 3C3 (3C3-1 y 3C3-2), 2G6, 8A6, 9G7 (9G7-1 y 9G7-2), 14E3, 19H8 (19H8-1 y 19H8-2) y 6G10 se indican en SEQ ID NO: 20, 33, 46, 62, 78, 91, 106, 122, 138 y 342, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR2 de V_H de 28F3, 19D3, 18E10, 3C3 (3C3-1 y 3C3-2), 2G6, 8A6, 9G7 (9G7-1 y 9G7-2), 14E3, 19H8 (19H8-1 y 19H8-2) y 6G10 se indican en SEQ ID NO: 21, 34, 47, 63, 79, 92, 107, 123, 139 y 343, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR3 de V_H de 28F3, 19D3, 18E10, 3C3 (3C3-1 y 3C3-2), 2G6, 8A6, 9G7 (9G7-1 y 9G7-2), 14E3, 19H8 (19H8-1 y 19H8-2) y 6G10 se indican en SEQ ID NO: 22, 35, 48, 64, 80, 93, 108, 124, 140 y 344. Las secuencias de aminoácidos de CDR1 de V_L de 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 y 6G10 se indican en SEQ ID NO: 23, 36, 49, 65, 68, 81, 94, 109, 112, 125, 141, 144 y 345, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR2 de V_L de 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 y 6G10 se indican en SEQ ID NO: 24, 37, 50, 66, 69, 82, 95, 110, 113, 126, 142, 145 y 346, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR3 de V_L de 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 y 6G10 se indican en SEQ ID NO: 25, 38, 51, 67, 70, 83, 96, 111, 114, 127, 143, 146 y 347, respectivamente. Las regiones CDR se delinean con el sistema Kabat (Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación NIH N.º 91-3242).

Debido a que cada uno de estos anticuerpos se fija a GITR y que la especificidad de fijación al antígeno se proporciona, en primer lugar, a través de las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias CDR1, 2 y 3 de V_H y las secuencias CDR1, 2 y 3 de V_L se pueden “mezclar y hacer coincidir” (es decir, las CDR de diferentes anticuerpos se pueden mezclar y hacer coincidir, a pesar de que cada anticuerpo debe contener una CDR1, 2 y 3 de V_H y una CDR1, 2 y 3 de V_L) para crear otras moléculas de fijación a anti-GITR descritas en la presente. La fijación a GITR de estos anticuerpos “mezclados y coincidentes” se puede evaluar usando los ensayos de fijación descritos anteriormente y en los ejemplos (por ejemplo, ELISA). Preferentemente, cuando las secuencias CDR de V_H se mezclan y se hacen coincidir, las secuencias CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de V_H particular se reemplaza por una secuencia CDR estructuralmente similar. Asimismo, cuando las

secuencias CDR de V_L se mezclan y se hacen coincidir, las secuencias CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_L particular se reemplaza, preferentemente, por una secuencia CDR estructuralmente similar. Será evidente para las personas del oficio de nivel medio que las secuencias de V_H y V_L novedosas se pueden crear sustituyendo una o más secuencia de regiones CDR de V_H y/o V_L con secuencias estructuralmente similares a las secuencias CDR descritas en la presente para los anticuerpos monoclonales 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 y 6G10.

Se proporcionan en la presente anticuerpos aislados, o una porción de fijación al antígeno de estos, que comprenden:

(a) una región variable CDR1 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 20, 33, 46, 62, 78, 91, 106, 122, 138 y 342;

(b) una región variable CDR2 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, 34, 47, 63, 79, 92, 107, 123, 139 y 343;

(c) una región variable CDR3 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 22, 35, 48, 64, 80, 93, 108, 124, 140 y 344;

(d) una región variable CDR1 de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 23, 36, 49, 65, 68, 81, 94, 109, 112, 125, 141, 144 y 345;

(e) una región variable CDR2 de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24, 37, 50, 66, 69, 82, 95, 110, 113, 126, 142, 145 y 346; y

(f) una región variable CDR3 de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 25, 38, 51, 67, 70, 83, 96, 111, 114, 127, 143, 146 y 347;

en donde el anticuerpo se fija específicamente a GITR humano.

En una forma de realización, el anticuerpo que comprende regiones variables de la cadena liviana y pesada, en donde las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada comprenden:

(a) SEQ ID NO: 20-22;

(b) SEQ ID NO: 33-35;

(c) SEQ ID NO: 46-48;

- (d) SEQ ID NO: 62-64;
- (e) SEQ ID NO: 78-80;
- (f) SEQ ID NO: 91-93;
- (g) SEQ ID NO: 106-108;
- (h) SEQ ID NO: 122-124;
- (i) SEQ ID NO: 138-140; o
- (j) SEQ ID NO: 342-344;

en donde el anticuerpo se fija específicamente a GITR humano.

En otra forma de realización, el anticuerpo comprende regiones variables de la cadena liviana y pesada, en donde las regiones variable CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana comprenden:

- (a) SEQ ID NO: 23-25;
- (b) SEQ ID NO: 36-38;
- (c) SEQ ID NO: 49-51;
- (d) SEQ ID NO: 65-67;
- (e) SEQ ID NO: 68-70;
- (f) SEQ ID NO: 81-83;
- (f) SEQ ID NO: 94-96;
- (g) SEQ ID NO: 109-111;
- (h) SEQ ID NO: 112-114;
- (i) SEQ ID NO: 125-127;
- (j) SEQ ID NO: 141-143;
- (k) SEQ ID NO: 144-146; o
- (l) SEQ ID NO: 345-347;

en donde el anticuerpo se fija específicamente a GITR humano.

En una forma de realización particular, el anticuerpo comprende regiones variables de la cadena liviana y pesada, en donde:

(a) las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 20-22, respectivamente, las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana comprenden SEQ ID NO: 23-25, respectivamente;

(b) las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada comprenden SEQ ID NO: 33-35, respectivamente, las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana comprenden SEQ ID NO: 36-38, respectivamente;

(c) las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada comprenden SEQ ID NO: 46-48, respectivamente, las regiones variables CDR1, CDR2

y CDR3 de la cadena liviana comprenden SEQ ID NO: 49-51, respectivamente;

(d) las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada comprenden SEQ ID NO: 62-64, respectivamente, las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana comprenden SEQ ID NO: 65-67, respectivamente;

(e) las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada comprenden SEQ ID NO: 62-64, respectivamente, las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana comprenden SEQ ID NO: 68-70, respectivamente;

(f) las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada comprenden SEQ ID NO: 78-80, respectivamente, las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana comprenden SEQ ID NO: 81-83, respectivamente;

(g) las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada comprenden SEQ ID NO: 91-93, respectivamente, las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana comprenden SEQ ID NO: 94-96, respectivamente;

(h) las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada comprenden SEQ ID NO: 106-108, respectivamente, las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana comprenden SEQ ID NO: 109-111, respectivamente;

(i) las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada comprenden SEQ ID NO: 106-108, respectivamente, las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana comprenden SEQ ID NO: 112-114, respectivamente;

(j) las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada comprenden SEQ ID NO: 122-124, respectivamente, las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana comprenden SEQ ID NO: 125-127, respectivamente;

(k) las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada comprenden SEQ ID NO: 138-140, respectivamente, las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana comprenden SEQ ID NO: 141-143, respectivamente;

(l) las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada comprenden SEQ ID NO: 138-140, respectivamente, las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana comprenden SEQ ID NO: 144-146, respectivamente; o

(m) las regiones variables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada comprenden SEQ ID NO: 342-344, respectivamente, las regiones variables CDR1,

CDR2 y CDR3 de la cadena liviana comprenden SEQ ID NO: 345-347, respectivamente;

en donde el anticuerpo se fija específicamente a GITR humano.

Un dominio VH, o una o más CDR de este, descrito en la presente se puede ligar a un dominio constante para formar una cadena pesada, por ejemplo, una cadena pesada de longitud completa. De manera similar, un dominio VL, o una o más CDR de este, descrito en la presente se puede ligar a un dominio constante para formar una cadena liviana, por ejemplo, una cadena liviana de longitud completa. Una cadena pesada de longitud completa (con la excepción de la lisina del terminal C (K) o con la excepción de la glicina y la lisina del terminal C (GK), que pueden estar ausentes) y una cadena liviana de longitud completa se combinan para formar un anticuerpo de longitud completa.

Un dominio VH descrito en la presente se puede fusionar al dominio constante de una IgG humana, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, que son naturales o modificadas, por ejemplo, como también se describe en la presente. Por ejemplo, un dominio VH puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquier dominio VH descrito en la presente fusionada a la siguiente secuencia de aminoácidos de IgG1 humana:

```
ASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV
LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK RVEPKSCDKT HTPPCPAPE
LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD
KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG (SEQ ID NO: 7)
```

El dominio constante de IgG1 humana también puede ser el de una variante alotípica. Por ejemplo, una variante alotípica de IgG1 comprende un R107K, E189D y M191L (subrayados anteriormente) y una numeración de acuerdo con la de SEQ ID NO: 7). En la región pesada de longitud completa, estas sustituciones de aminoácidos se numeran R214K, E356D y M358L.

Un dominio VL descrito en la presente puede estar fusionado al dominio constante de una cadena liviana Kappa o Lambda humana. Por ejemplo, un dominio VL puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquier dominio VL descrito en la presente fusionada a la siguiente secuencia de aminoácidos de la cadena liviana kappa de IgG1 humana:

```
RTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD
STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO: 12)
```

En algunas formas de realización, la región constante de la cadena pesada comprende una lisina u otro aminoácido en el terminal C, por ejemplo, comprende los siguientes últimos aminoácidos: LSPGK (SEQ ID NO: 220) para la cadena pesada. En algunas formas de realización, la región constante de la cadena pesada no tiene uno o más aminoácidos en el terminal C, y tiene, por ejemplo, la secuencia del terminal C LSPG (SEQ ID NO: 276) o LSP.

Las secuencias de aminoácidos de los ejemplos de cadenas livianas y pesadas se indican en la Tabla 11 y corresponden a SEQ ID NO: 15, 17, 18, 28, 30, 31, 41, 43, 44, 55, 58, 59, 73, 75, 76, 86, 88, 89, 100, 102, 103, 117, 119, 120, 131, 134, 135, 227-275, 337, 339, 340, 348-352, 361 y 362 para las cadenas pesadas y SEQ ID NO: 16, 19, 29, 32, 42, 45, 56, 57, 60, 61, 74, 87, 90, 101, 104, 105, 118, 121, 132, 133, 136, 137, 338, 341 y 371 para las cadenas livianas.

Las cadenas livianas y pesadas que comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% o 70% idéntica a cualquiera de las cadenas livianas o pesadas indicadas en la Tabla 11 (o sus regiones variables), por ejemplo, SEQ ID NO: 13-19, 26-32, 40-45, 52-61, 71-77, 84-90, 97-105, 116-121, 128-137, 227-275, 337-341, 348-352, 361, 362 y 371 se pueden usar para formar anticuerpos GITR antihumano que tienen las características deseadas, por ejemplo, aquellas también descritas en la presente. Los ejemplos de variantes son aquellos que comprenden una variación alotípica, por ejemplo, en el dominio constante, y/o una mutación en las regiones variables o constantes, tales como las mutaciones descritas en la presente. Las cadenas livianas y pesadas que comprenden una secuencia de aminoácidos que difiere en, como máximo, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 aminoácidos (por sustitución, adición o eliminación) de cualquiera de las cadenas livianas o pesadas indicadas en la Tabla 11 (o sus regiones variables) se pueden usar para formar anticuerpos GITR antihumano que tienen las características deseadas, por ejemplo, aquellas también descritas en la presente.

En diversas formas de realización, los anticuerpos descritos anteriormente exhiben 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o todas las siguientes propiedades funcionales:

(1) se fijan a GITR humano soluble, por ejemplo, con una K_D de 10 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se midió mediante Biacore;

(2) se fijan a GITR humano unido a la membrana, por ejemplo, con una

K_D de 1 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 1 nM), por ejemplo, como se midió mediante Scatchard;

(3) se fijan a GITR humano unido a la membrana, por ejemplo, con un EC_{50} de 1 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 1 nM), por ejemplo, como se midió mediante FACS;

(4) se fijan a GITR de *Macaca fascicularis*, por ejemplo, se fijan a GITR de *Macaca fascicularis* unido a la membrana, por ejemplo, con un EC_{50} de 10 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 10 nM), como se midió mediante FACS;

(5) inducen o mejoran la activación de linfocitos T, tal como en presencia del acoplamiento CD3 (por ejemplo, en presencia de concentraciones anti-CD3 subóptimas), como se demostró mediante (i) el aumento de la producción de IL-2 y/o IFN- γ en linfocitos T que expresan GITR y/o (ii) la mejora en la proliferación de linfocitos T;

(6) inducen o mejoran la activación de linfocitos T sin requerir la reticulación multivalente;

(7) inhiben la fijación del ligando GITR a GITR en células 3A9-hGITR, por ejemplo, con EC_{50} de 1 μ g/ml o menos, como se midió mediante FACS;

(8) inhiben parcialmente, como máximo, la fijación del ligando GITR a GITR en linfocitos T activados;

(9) se fijan a un epítipo conformacional en GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4), por ejemplo, un epítipo discontinuo en las secuencias de aminoácidos PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) y CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218);

(10) se fijan a GITR humano glucosilado y no glucosilado ligado a O y ligado a N;

(11) tienen actividad agonista en ausencia de la fijación a un receptor Fc, pero en donde la fijación a un receptor Fc también mejora la actividad agonista; y

(12) compiten en cualquier dirección o en ambas direcciones, para fijarse a GITR humano, con 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 y/o 6G10.

Los anticuerpos incluyen, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

En una forma de realización, los anticuerpos anti-GITR descritos en la presente se fijan a GITR humano glucosilado (por ejemplo, glucosilación ligada a N o ligada a

O) y no glucosilado.

En una forma de realización, los anticuerpos anti-GITR descritos en la presente se fijan a un epítipo conformacional.

En una forma de realización, los anticuerpos anti-GITR descritos en la presente se fijan a residuos de aminoácidos en la siguiente región de GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4):

QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGE (SEQ ID NO: 215), correspondiente a los residuos de aminoácidos 1-39 de las isoformas 1, 2 o 3 de GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4).

En una forma de realización, el anticuerpo anti-GITR descrito en la presente se fija a residuos de aminoácidos en la siguiente región de GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4):

QRPTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 216), correspondiente a los residuos de aminoácidos 1-20 de las isoformas 1, 2 o 3 de GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4).

En una forma de realización, el anticuerpo anti-GITR descrito en la presente se fija a residuos de aminoácidos en las siguientes regiones de GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4):

PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) y CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218).

Dominios constantes de la cadena pesada modificados

Como se analiza en la presente, la región constante de la cadena pesada de anticuerpos anti-GITR descrita en la presente puede ser de cualquier isotipo, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, o combinaciones de estos y/o modificaciones de estos. Un anticuerpo anti-GITR puede tener una función efectora o puede tener una función efectora reducida o no puede tenerla. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR comprenden una región constante de la cadena pesada modificada que proporciona mejores propiedades al anticuerpo. Como se muestra en los ejemplos, los anticuerpos anti-GITR, que tienen una región constante de la cadena pesada modificada que comprende una bisagra de IgG2, son agonistas más potentes con respecto a anticuerpos que tienen la misma región variable pero con una bisagra de no IgG2. Por ejemplo, un anticuerpo que comprende una bisagra de IgG2, un dominio CH2 y CH3 del isotipo IgG1, y ya sea con o sin función efectora, tiene una mejor actividad agonista según se mide mediante la secreción mejorada de IFN- γ e IL-2 de los linfocitos T incubados con los anticuerpos. Sin pretender limitarse a un

mecanismo de acción específico, se supone que los anticuerpos anti-GITR que tienen bisagras de IgG2 forman complejos anticuerpo/antígeno de mayor tamaño y se internalizan más eficazmente, lo que da como resultado un aumento de la actividad agonista. Se cree que la formación de complejos de mayor tamaño es el resultado de una mayor rigidez de la bisagra de IgG2 con respecto a las bisagras de otros isotipos (por ejemplo, IgG1, IgG3 e IgG4). Como se describe en los ejemplos, una actividad agonista mejorada no pareciera estar relacionada con una mayor o menor afinidad del anticuerpo. En consecuencia, en la presente se proporcionan anticuerpos anti-GITR que tienen una región constante de la cadena pesada modificada, en donde los anticuerpos anti-GITR tienen una actividad agonista mejorada, y en donde la afinidad del anticuerpo con la región constante de la cadena pesada modificada se fija a GITR con una afinidad similar a las mismas regiones variables, pero con una región constante de la cadena pesada diferente.

En consecuencia, en la presente también se proporcionan métodos para mejorar la actividad agonista de anticuerpos anti-GITR, que comprenden proporcionar un anticuerpo anti-GITR que tiene una bisagra de no IgG2 y reemplazar la bisagra de no IgG2 con una bisagra de IgG2. Los anticuerpos que se pueden beneficiar de esa modificación incluyen cualquier anticuerpo anti-GITR, tal como los que se conocen en el estado de la técnica, por ejemplo, anticuerpo 6C8 o un anticuerpo humanizado que tiene CDR de 6C8, como se describe, por ejemplo, en WO2006/105021; un anticuerpo descrito en WO2011/028683, JP2008278814, KR20080105674, US20040072566, US2001472565, US20140065152 o en WO2015/031667.

En algunas formas de realización, una región constante de la cadena pesada modificada comprende una bisagra del isotipo IgG2 (una “bisagra de IgG2”) y un dominio CH1, CH2 y CH3. En algunas formas de realización, una región constante de la cadena pesada modificada comprende una bisagra de IgG2 y un dominio CH1, CH2 y CH3, en donde al menos uno de los dominios CH1, CH2 y CH3 no es del isotipo IgG2. La bisagra de IgG2 puede ser una bisagra de IgG2 de tipo silvestre, por ejemplo, una bisagra de IgG2 humana de tipo silvestre (por ejemplo, ERKCCVECPAPPVAG; SEQ ID NO: 291) o una variante de aquella, siempre que la bisagra de IgG2 retenga la capacidad de conferir al anticuerpo una actividad mejorada con respecto al mismo anticuerpo que comprende una bisagra de no IgG2. En algunas formas de realización, una variante de la bisagra de IgG2 retiene una rigidez o firmeza similar a la de una bisagra de IgG2 de tipo silvestre. La rigidez de una bisagra se puede determinar, por ejemplo, mediante modelación por computadora,

microscopía electrónica, espectroscopía, tal como resonancia magnética nuclear (RMN), cristalografía de rayos X (factores B) o ultracentrifugación analítica de velocidad de sedimentación (AUC), para medir o comparar el radio de giro de anticuerpos que comprenden la bisagra. Una bisagra puede tener una rigidez similar o mayor con respecto a otra bisagra si un anticuerpo que comprende la bisagra tiene un valor obtenido de una de las pruebas descritas en la oración anterior que difiere del valor del mismo anticuerpo con una bisagra diferente, por ejemplo, una bisagra de IgG1, en menos de 5%, 10%, 25%, 50%, 75% o 100%. La persona del oficio de nivel medio sería capaz de determinar a partir de las pruebas si una bisagra tiene al menos una rigidez similar a la de otra bisagra mediante la interpretación de los resultados de esas pruebas. Un ejemplo de variante de la bisagra de IgG2 humana es una bisagra de IgG2 que comprende una sustitución de uno o más de los cuatro residuos de cisteína (es decir, C219, C220, C226 y C229). Una cisteína se puede reemplazar por una serina. Una bisagra de IgG2 de ejemplo es una bisagra de IgG2 humana que comprende una mutación C219S (por ejemplo, ERKSCVECPPCPAPPVAG; SEQ ID NO: 292). Otras variantes de la bisagra de IgG2 que se pueden usar incluyen bisagras de IgG2 humana que comprenden una sustitución C220, C226 y/o C229, por ejemplo, una mutación C220S, C226S o C229S (que se puede combinar con una mutación C219S). Una bisagra de IgG2 puede ser también una bisagra de IgG2 en donde una porción de la bisagra es la de otro isotipo (es decir, es una bisagra quimérica), siempre que la rigidez de la bisagra quimérica es al menos similar a la de una bisagra de IgG2 de tipo silvestre. Por ejemplo, una bisagra de IgG2 puede ser una bisagra de IgG2 en donde la bisagra inferior (como se define en la Tabla 2) es de un isotipo IgG1, y es, por ejemplo, una bisagra inferior de IgG1 de tipo silvestre. Otras mutaciones de la bisagra de IgG2 que se pueden usar en una bisagra de IgG2 incluyen las mutaciones SE (S267E), SELF (S267E/L328F), SDIE (S239D/I332E), SEFF y GASDALIE (G236A/S239D/A330L/I332E).

Una bisagra “híbrida” o “quimérica” se refiere a que es de un isotipo específico si más de la mitad de los aminoácidos consecutivos de la bisagra son de ese isotipo. Por ejemplo, se considera que una bisagra que tiene una bisagra superior e intermedia de IgG2 y la bisagra inferior de IgG1 es una bisagra de IgG2.

En algunas formas de realización, una región constante de la cadena pesada modificada comprende un dominio CH1 que es un dominio CH1 de tipo silvestre del isotipo IgG1 o IgG2 (“dominio CH1 de IgG1” o “dominio CH1 de IgG2,” respectivamente). También se pueden usar los dominios CH1 de los isotipos IgG3 e

IgG4 (“dominio CH1 de IgG3” y “dominio CH1 de IgG2,” respectivamente). Un dominio CH1 puede también ser una variante de un dominio CH1 de tipo silvestre, por ejemplo, una variante de un dominio CH1 de tipo silvestre de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Los ejemplos de variantes de dominios CH1 incluyen A114C y T173C.

En algunas formas de realización, una región constante de la cadena pesada modificada comprende un dominio CH2 que es un dominio CH2 de tipo silvestre de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (“dominio CH2 de IgG1”, “dominio CH2 de IgG2”, “dominio CH2 de IgG3” o “dominio CH2 de IgG4”, respectivamente). Un dominio CH2 puede también ser una variante de un dominio CH2 de tipo silvestre, por ejemplo, una variante de un dominio CH2 de tipo silvestre de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Los ejemplos de variantes de dominios CH2 incluyen variantes que modulan una actividad biológica de la región Fc de un anticuerpo, tal como ADCC o CDC, o que modulan la semivida del anticuerpo o su estabilidad. En una forma de realización, el dominio CH2 es un dominio CH2 de IgG1 humana con una mutación A330S y P331S, en donde el dominio CH2 tiene una función efectora reducida con respecto a la misma mutación de CH2 sin las mutaciones. Asimismo, se establecen otras mutaciones en otras secciones de la presente.

En algunas formas de realización, una región constante de la cadena pesada modificada comprende un dominio CH3 que es un dominio CH3 de tipo silvestre de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (“dominio CH3 de IgG1”, “dominio CH3 de IgG2”, “dominio CH3 de IgG3” o “dominio CH3 de IgG4”, respectivamente). Un dominio CH3 puede también ser una variante de un dominio CH3 de tipo silvestre, por ejemplo, una variante de un dominio CH3 de tipo silvestre de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Las variantes de ejemplo de dominios CH3 incluyen variantes que modulan una actividad biológica de la región Fc de un anticuerpo, tal como ADCC o CDC, o que modulan la semivida del anticuerpo o su estabilidad.

En general, las variantes de los dominios bisagra, CH1, CH2 o CH3 pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más mutaciones y/o, como máximo, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mutaciones, o 1-10 o 1-5 mutaciones, o comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la del dominio de tipo silvestre correspondiente (dominio bisagra, CH1, CH2 o CH3, respectivamente), siempre que la región constante de la cadena pesada que comprende la variante específica retenga la actividad biológica necesaria.

La Tabla 3 establece regiones constantes de la cadena pesada humanas de

ejemplo que comprenden dominios bisagra, CH1, CH2 y/o CH3 humanos, en donde cada dominio es un dominio de tipo silvestre o una variante de este que proporciona la actividad biológica deseada a la región constante de la cadena pesada. Una célula sin rellenar en la Tabla 3 indica que el dominio está presente o no, y si está presente, puede ser de cualquier isotipo, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Por ejemplo, un anticuerpo que comprende la región constante de la cadena pesada 1 en la Tabla 3 es un anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que comprende al menos una bisagra de IgG2, y que también puede comprender un dominio CH1, CH2 y/o CH3, y si está presente, el dominio CH1, CH2 y/o CH3 es de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. A modo de ejemplo para comprender la Tabla 3, un anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada 8 es un anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que comprende un dominio CH1 de IgG1, y una bisagra de IgG2, un dominio CH2 de IgG1, y que también puede o no comprender un dominio CH3 que, si está presente, puede ser de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

Tabla 3. Configuraciones de ejemplo de regiones constantes de la cadena pesada humanas

MHCCR*	CH1	Bisagra	CH2	CH3
1		IgG2		
2	IgG1	IgG2		
3	IgG2	IgG2		
4		IgG2	IgG1	
5		IgG2	IgG2	
6		IgG2		IgG1
7		IgG2		IgG2
8	IgG1	IgG2	IgG1	
9	IgG1	IgG2	IgG2	
10	IgG2	IgG2	IgG1	
11	IgG2	IgG2	IgG2	
12	IgG1	IgG2		IgG1
13	IgG1	IgG2		IgG2
14	IgG2	IgG2		IgG1
15	IgG2	IgG2		IgG2
16		IgG2	IgG1	IgG1
17		IgG2	IgG1	IgG2
18		IgG2	IgG2	IgG1
19		IgG2	IgG2	IgG2
20	IgG1	IgG2	IgG1	IgG1
21	IgG1	IgG2	IgG1	IgG2
22	IgG1	IgG2	IgG2	IgG1
23	IgG1	IgG2	IgG2	IgG2
24	IgG2	IgG2	IgG1	IgG1

MHCCR*	CH1	Bisagra	CH2	CH3
25	IgG2	IgG2	IgG1	IgG2
26	IgG2	IgG2	IgG2	IgG1
27	IgG2	IgG2	IgG2	IgG2

* Región constante de la cadena pesada modificada

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR comprende una región constante de la cadena pesada que se muestra en la Tabla 3 y tiene una actividad agonista mejorada con respecto al mismo anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que no comprende esa región constante de la cadena pesada específica. En algunas formas de realización, un anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que se muestra en la Tabla 3 tiene una actividad agonista mejorada con respecto al mismo anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que no comprende una bisagra de IgG2 o la misma bisagra de IgG2. En algunas formas de realización, un anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que se muestra en la Tabla 3 tiene una actividad agonista mejorada con respecto al mismo anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que comprende una bisagra de no IgG2 y comprende, por ejemplo, una bisagra de IgG1, IgG3 o IgG4. En algunas formas de realización, un anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que se muestra en la Tabla 3 tiene una actividad agonista mejorada con respecto al mismo anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que no comprende uno o más del mismo dominio bisagra, CH1, CH2 o CH3. Por ejemplo, en algunas formas de realización, un anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que se muestra en la Tabla 3 tiene una actividad agonista mejorada con respecto al mismo anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que no comprende una bisagra de IgG2 y un dominio CH1, CH2 y/o CH3 del isotipo específico. Por ejemplo, un anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada 22 que se muestra en la Tabla 3 puede tener una actividad agonista mejorada con respecto a (i) el mismo anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que no comprende una bisagra de IgG2, y comprende, por ejemplo, una bisagra de no IgG2 (por ejemplo, una bisagra de IgG1, IgG3 o IgG4); (ii) el mismo anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que no comprende una bisagra de IgG2 y CH1 de IgG1, y comprende, por ejemplo, una bisagra de no IgG2 y/o CH1 de no IgG1 ; (iii) el mismo anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que no

comprende una bisagra de IgG2 y CH2 de IgG2, y comprende, por ejemplo, una bisagra de no IgG2 y/o CH2 de no IgG2; (iv) el mismo anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que no comprende una bisagra de IgG2 y CH3 de IgG1, y comprende, por ejemplo, una bisagra de no IgG2 y/o CH3 de no-IgG1; (v) el mismo anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que no comprende una bisagra de IgG2, CH1 de IgG1 y CH2 de IgG2, y comprende, por ejemplo, una bisagra de no IgG2 y/o CH1 de no IgG1 y/o CH2 de no IgG2 ; (vi) el mismo anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que no comprende una bisagra de IgG2, CH1 de IgG1 y CH3 de IgG1, y comprende, por ejemplo, una bisagra de no IgG2 y/o CH1 de no IgG1 y/o CH3 de no IgG1; (vii) el mismo anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que no comprende una bisagra de IgG2, CH2 de IgG2 y CH3 de IgG1, y comprende, por ejemplo, una bisagra de no IgG2 y/o CH de no IgG2 y/o CH3 de no IgG1; (viii) o el mismo anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que no comprende una bisagra de IgG2, CH1 de IgG1, CH2 de IgG2 y CH3 de IgG1, y comprende, por ejemplo, una bisagra de no IgG2 y/o CH1 de no IgG1 y/o CH2 de no IgG2 y/o CH3 de no IgG1.

Las regiones constantes de la cadena pesada modificadas de ejemplo que se pueden ligar a regiones variables de anti-GITR, por ejemplo, aquella descritas en la presente, se proporcionan en la Tabla 4, la cual indica la identidad de cada uno de los dominios.

Tabla 4: Regiones constantes de la cadena pesada modificadas de ejemplo

Región constante de la cadena pesada modificada	CH1	Bisagra	CH2	CH3	SEQ ID NO de la totalidad MHCCR	ID de
IgG1-IgG2-IgG1f	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:278	IgG2/IgG1 SEQ ID NO:293	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:280	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:282	SEQ NO:283	ID
IgG1-IgG2-IgG1f2	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:278	IgG2 de tipo silvestre SEQ ID NO:291	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:280	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:282	SEQ NO:287	ID
IgG1-IgG2CS-IgG1f	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:278	IgG2C219S/IgG1 SEQ ID NO:294	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:280	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:282	SEQ NO:284	ID
IgG1-IgG2CS-IgG1f2	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:278	IgG2 C219S SEQ ID NO:292	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:280	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:282	SEQ NO:288	ID
IgG2-IgG1f	IgG2 de tipo silvestre SEQ ID NO:279	IgG2/IgG1 SEQ ID NO:293	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:280	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:282	SEQ NO:223	ID
IgG2-IgG1f2	IgG2 de tipo silvestre SEQ ID NO:279	IgG2 de tipo silvestre SEQ ID NO:291	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:280	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:282	SEQ NO:289	ID
IgG2CS-IgG1f	IgG2 de tipo silvestre SEQ ID NO:279	IgG2C219S/IgG1 SEQ ID NO:294	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:280	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:282	SEQ NO:225	ID

Región constante de la cadena pesada modificada	CH1	Bisagra	CH2	CH3	SEQ ID NO de la totalidad de MHCCR
IgG2CS-IgG1f2	IgG2 de tipo silvestre SEQ ID NO:279	IgG2 C219S SEQ ID NO:292	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:280	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:290
IgG1-IgG2-IgG1.1f	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:278	IgG2 de tipo silvestre SEQ ID NO:291	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:281	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:285
IgG1-IgG2CS-IgG1.1f	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:278	IgG2 C219S SEQ ID NO:292	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:281	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:286
IgG2-IgG1.1f	IgG2 de tipo silvestre SEQ ID NO:279	IgG2 de tipo silvestre SEQ ID NO:291	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:281	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:224
IgG2CS-IgG1.1f	IgG2 de tipo silvestre SEQ ID NO:279	IgG2 C219S SEQ ID NO:292	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:281	IgG1 de tipo silvestre SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:226

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR comprende una región constante de la cadena pesada modificada que comprende una bisagra de IgG2 que comprende SEQ ID NO: 291, 292, 293 o 294, o una variante de aquella, tal como una bisagra de IgG2 que comprende una secuencia de aminoácidos que (i) difiere de SEQ ID NO: 291, 292, 293 o 294 en 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos; (ii) difiere de SEQ ID NO: 291, 292, 293 o 294 en, como máximo, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos; (iii) difiere de SEQ ID NO: 291, 292, 293 o 294 en 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 o 3-5 sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos y/o (iv) comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a SEQ ID NO: 291, 292, 293 o 294, en donde en cualquiera de (i)-(iv), una sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución conservadora de aminoácidos o una sustitución no conservadora de aminoácidos; y en donde la región constante de la cadena pesada modificada proporciona una actividad agonista mejorada a un anticuerpo anti-GITR con respecto a otra región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada que comprende una bisagra de no IgG2 o con respecto a la misma región constante de la cadena pesada modificada que comprende una bisagra de no IgG2.

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR comprende una región constante de la cadena pesada modificada que comprende un dominio CH1 de IgG1 que comprende SEQ ID NO: 278 o un dominio CH1 de IgG2 que comprende SEQ ID NO: 279, o una variante de SEQ ID NO: 278 o 279, cuya variante (i) difiere de SEQ ID NO: 278 o 279 en 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos; (ii) difiere de SEQ ID NO: 278 o 279 en, como máximo, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos; (iii) difiere de SEQ ID NO:

278 o 279 en 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 o 3-5 sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos y/o (iv) comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a SEQ ID NO: 278 o 279, en donde en cualquiera de (i)-(iv), una sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución conservadora de aminoácidos o una sustitución no conservadora de aminoácidos; y en donde el anticuerpo anti-GITR que comprende una región constante de la cadena pesada modificada tiene una actividad agonista mejorada con respecto a la del anticuerpo anti-GITR pero con otra región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada que comprende una bisagra de no IgG2 o con respecto a la misma región constante de la cadena pesada modificada que comprende una bisagra de no IgG2.

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR comprende una región constante de la cadena pesada modificada que comprende un dominio CH2 de IgG1 que comprende SEQ ID NO: 280 o 281, o una variante de SEQ ID NO: 280 o 281, cuya variante (i) difiere de SEQ ID NO: 280 o 281 en 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos; (ii) difiere de SEQ ID NO: 280 o 281 en, como máximo, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos; (iii) difiere de SEQ ID NO: 280 o 281 en 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 o 3-5 sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos y/o (iv) comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a SEQ ID NO: 280 o 281, en donde en cualquiera de (i)-(iv), una sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución conservadora de aminoácidos o una sustitución no conservadora de aminoácidos; y en donde la región constante de la cadena pesada modificada proporciona una actividad agonista mejorada a un anticuerpo anti-GITR con respecto a la de otra región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada que comprende una bisagra de no IgG2 o con respecto a la misma región constante de la cadena pesada modificada que comprende una bisagra de no IgG2.

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR comprende una región constante de la cadena pesada modificada que comprende un dominio CH3 de IgG1 que comprende SEQ ID NO: 282, o una variante de SEQ ID NO: 282, cuya variante (i) difiere de SEQ ID NO: 282 en 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos; (ii) difiere de SEQ ID NO: 282 en, como máximo, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos; (iii) difiere de SEQ ID NO: 282 en 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 o 3-5 sustituciones, adiciones o eliminaciones de

aminoácidos y/o (iv) comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 282, en donde en cualquiera de (i)-(iv), una sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución conservadora de aminoácidos o una sustitución no conservadora de aminoácidos; y en donde la región constante de la cadena pesada modificada proporciona una actividad agonista mejorada con respecto a la de otra región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada que comprende una bisagra de no IgG2 o con respecto a la misma región constante de la cadena pesada modificada que comprende una bisagra de no IgG2.

Las regiones constantes de la cadena pesada modificadas pueden también comprender una combinación de los dominios bisagra, CH1, CH2 y CH3 descritos anteriormente.

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR comprende una región constante de la cadena pesada modificada que comprende SEQ ID NO: 223, 224, 225, 226, 283, 284, 285 286, 287, 288, 289 o 290, o una variante de SEQ ID NO: 223, 224, 225, 226, 283, 284, 285 286, 287, 288, 289 o 290, cuya variante (i) difiere de SEQ ID NO: 223, 224, 225, 226, 283, 284, 285 286, 287, 288, 289 o 290 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos; (ii) difiere de SEQ ID NO: 223, 224, 225, 226, 283, 284, 285 286, 287, 288, 289 o 290 en, como máximo, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos; (iii) difiere de SEQ ID NO: 223, 224, 225, 226, 283, 284, 285 286, 287, 288, 289 o 290 en 1-5, 1-3, 1-2, 2-5, 3-5, 1-10 o 5-10 sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos y/o (iv) comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a SEQ ID NO: 223, 224, 225, 226, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289 o 290, en donde en cualquiera de (i)-(iv), una sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución conservadora de aminoácidos o una sustitución no conservadora de aminoácidos; y en donde la región constante de la cadena pesada modificada proporciona una actividad agonista mejorada con respecto a la de otra región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada que comprende una bisagra de no IgG2 o con respecto a la misma región constante de la cadena pesada modificada que comprende una bisagra de no IgG2.

Las regiones constantes de la cadena pesada modificadas pueden tener (i) una función efectora similar, reducida o aumentada (por ejemplo, fijación a FcγR) con respecto a una región constante de la cadena pesada de tipo silvestre y o (ii) una

semivida similar, reducida o aumentada (o la fijación al receptor FcRn) con respecto a una región constante de la cadena pesada de tipo silvestre.

III. Anticuerpos que tienen secuencias de la línea germinal particulares

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR comprende una región variable de la cadena pesada de un gen de inmunoglobulina de la cadena pesada de la línea germinal particular y/o una región variable de la cadena liviana de un gen de inmunoglobulina de la cadena liviana de la línea germinal particular.

Como se demuestra en la presente, se prepararon anticuerpos humanos específicos para GITR que comprenden una región variable de la cadena pesada que es el producto o la derivación de un gen VH 3-33, gen VH 3-10, gen VH 3-15, VH 3-16, gen VH JH6b, gen VH 6-19, gen VH 4-34 y/o gen VH JH3b de la línea germinal humana. En consecuencia, se proporcionan en la presente anticuerpos monoclonales aislados, o porciones de fijación al antígeno de estos, que comprenden una región variable de la cadena pesada que es el producto o la derivación de un gen VH de la línea germinal humana seleccionado del grupo que consiste en: VH 3-33, VH 3-10, VH 3-15, VH 3-16, VH JH6b, VH 6-19, VH 4-34 y/o VH JH3b.

Se prepararon anticuerpos humanos específicos para GITR que comprenden una región variable de la cadena liviana que es el producto o la derivación de un gen VK L6, gen VK L18, gen VK L15, gen VK L20, gen VK A27, gen VK JK5, gen VK JK4, gen VK JK2 y gen VK JK1 de la línea germinal humana. En consecuencia, en la presente se proporcionan anticuerpos monoclonales aislados, o porciones de fijación al antígeno de estos, que comprenden una región variable de la cadena liviana que es el producto o la derivación de un gen VK de la línea germinal humana seleccionado del grupo que consiste en: VK L6, VK L18, VK L15, VK L20, VK A27, VK JK5, VK JK4, VK JK2 y VK JK1.

Los anticuerpos preferidos descritos en la presente son aquellos que comprenden una región variable de la cadena pesada que es el producto o la derivación de uno de los genes VH de la línea germinal humana enumerados anteriormente y que también comprenden una región variable de la cadena liviana que es el producto o la derivación de uno de los genes VK de la línea germinal humana enumerados anteriormente, como se muestra en las Figuras 2-11.

Como se usa en la presente, un anticuerpo humano comprende regiones variables de la cadena pesada o liviana que es “el producto” o “la derivación” de una secuencia de la línea germinal particular si las regiones variables del anticuerpo se

obtienen de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Estos sistemas incluyen inmunizar un ratón transgénico que tiene genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o analizar una genoteca de genes de inmunoglobulina exhibida en el fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es “el producto” o “la derivación” de una secuencia de inmunoglobulinas de la línea germinal humana se puede identificar como tal mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulinas de la línea germinal humana y mediante la selección de la secuencia de inmunoglobulinas de la línea germinal humana que se encuentra más cerca en secuencia (es decir, mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es “el producto” o “la derivación” de una secuencia de inmunoglobulinas de la línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas naturales o a la introducción intencional de mutación dirigida al sitio. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado es, en general, al menos 90 % idéntico en secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia de aminoácidos codificada mediante un gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se lo compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de la línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de la línea germinal murina). En algunos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 95%, o incluso al menos 96%, 97%, 98% o 99% idéntico en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada mediante el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. En general, un anticuerpo humano que deriva de una secuencia de la línea germinal humana particular exhibirá no más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada mediante el gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En algunos casos, el anticuerpo humano puede exhibir no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada mediante el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

IV. Anticuerpos homólogos

En la presente se abarcan anticuerpos que tienen regiones variables de la cadena pesada y liviana que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos preferidos descritos en la presente, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas

de los anticuerpos anti-GITR descritos en la presente.

Por ejemplo, un anticuerpo anti-GITR aislado, o una porción de fijación al antígeno de este, puede comprender una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena liviana, en donde:

(a) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, 26, 39, 52, 71, 84, 97, 115, 128 y 335, o comprende 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 o 1-50 cambios de aminoácidos (es decir, sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos) con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, 26, 39, 52, 71, 84, 97, 115, 128 y 335;

(b) la región variable de la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, 27, 40, 53, 54, 72, 85, 98, 99, 116, 129, 130 y 336, o comprende 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 o 1-50 cambios de aminoácidos (es decir, sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos) con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, 27, 40, 53, 54, 72, 85, 98, 99, 116, 129, 130 y 336;

(c) el anticuerpo se fija específicamente a GITR, y

(d) el anticuerpo exhibe 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o todas de las siguientes propiedades funcionales:

(1) se fija a GITR humano soluble, por ejemplo, con una K_D de 10 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se midió mediante Biacore;

(2) se fija a GITR humano unido a la membrana, por ejemplo, con una K_D de 1 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 1 nM), por ejemplo, como se midió mediante Scatchard;

(3) se fija a GITR humano unido a la membrana, por ejemplo, con un EC_{50} de 1 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 1 nM), por ejemplo, como se midió mediante FACS;

(4) se fija a GITR de *Macaca fascicularis*, por ejemplo, se fija a GITR de *Macaca fascicularis* unido a la membrana, por ejemplo, con un EC_{50} de 10 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se midió mediante

FACS;

(5) induce o mejora la activación de linfocitos T, tal como en presencia del acoplamiento CD3 (por ejemplo, en presencia de concentraciones anti-CD3 subóptimas), como se demostró mediante (i) el aumento de la producción de IL-2 y/o IFN- γ en linfocitos T que expresan GITR y/o (ii) la mejora en la proliferación de linfocitos T;

(6) induce o mejora la activación de linfocitos T sin requerir la reticulación multivalente;

(7) inhibe la fijación del ligando GITR a GITR en células 3A9-hGITR, por ejemplo, con un EC₅₀ de 1 μ g/ml o menos, como se midió mediante FACS;

(8) inhibe parcialmente, como máximo, la fijación del ligando GITR a GITR en linfocitos T activados;

(9) se fija a un epítipo conformacional en GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4), por ejemplo, un epítipo discontinuo en las secuencias de aminoácidos PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) y CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218);

(10) se fija a GITR humano glucosilado y no glucosilado ligado a O y ligado a N;

(11) tiene actividad agonista en ausencia de la fijación a un receptor Fc, pero en donde la fijación a un receptor Fc también mejora la actividad agonista;

(12) compite en cualquier dirección o en ambas direcciones, para fijarse a GITR humano, con 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 y 6G10.

En diversas formas de realización, el anticuerpo puede exhibir una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve, diez, once o todas las propiedades funcionales enumeradas en (1) a (12) anteriormente. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

Un anticuerpo anti-GITR aislado, o una porción de fijación al antígeno de este, pueden comprender una cadena pesada y una cadena liviana, en donde:

(a) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 17, 18, 28, 30, 31, 41, 43, 44, 55, 58, 59, 73, 75, 76, 86, 88, 89, 100, 102, 103, 117, 119, 120, 131, 134, 135, 227-275, 337, 339, 340, 348-352, 361 y 362, o comprende 1, 2, 3, 4, 5, 1-2,

1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 o 1-50 cambios de aminoácidos (es decir, sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos) con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 17, 18, 28, 30, 31, 41, 43, 44, 55, 58, 59, 73, 75, 76, 86, 88, 89, 100, 102, 103, 117, 119, 120, 131, 134, 135, 227-275, 337, 339, 340, 348-352, 361 y 362, siempre que, en algunas formas de realización, si la secuencia es de una cadena pesada no efectora, las mutaciones que hacen que la cadena pesada sea no efectora no se modifican (es decir, no se realiza ninguna modificación en A234, E235, A237, S330 y S331);

(b) la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, 19, 29, 32, 42, 45, 56, 57, 60, 61, 74, 87, 90, 101, 104, 105, 118, 121, 132, 133, 136, 137, 338, 341 y 371, o comprende 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 o 1-50 cambios de aminoácidos (es decir, sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos) con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, 19, 29, 32, 42, 45, 56, 57, 60, 61, 74, 87, 90, 101, 104, 105, 118, 121, 132, 133, 136, 137, 338, 341 y 371;

(c) el anticuerpo se fija específicamente a GITR, y

(d) el anticuerpo exhibe 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o todas de las siguientes propiedades funcionales:

(1) se fija a GITR humano soluble, por ejemplo, con una K_D de 10 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se midió mediante Biacore;

(2) se fija a GITR humano unido a la membrana, por ejemplo, con una K_D de 1 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 1 nM), por ejemplo, como se midió mediante Scatchard;

(3) se fija a GITR humano unido a la membrana, por ejemplo, con un EC_{50} de 1 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 1 nM), por ejemplo, como se midió mediante FACS;

(4) se fija a GITR de *Macaca fascicularis*, por ejemplo, se fija a GITR de *Macaca fascicularis*, unido a la membrana, por ejemplo, con un EC_{50} de 10 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se midió mediante FACS;

(5) induce o mejora la activación de linfocitos T, tal como en presencia del acoplamiento CD3 (por ejemplo, en presencia de concentraciones anti-CD3

subóptimas), como se demostró mediante (i) el aumento de la producción de IL-2 y/o IFN- γ en linfocitos T que expresan GITR y/o (ii) la mejora en la proliferación de linfocitos T;

(6) induce o mejora la activación de linfocitos T sin requerir la reticulación multivalente;

(7) inhibe la fijación del ligando GITR a GITR en células 3A9-hGITR, por ejemplo, con un EC₅₀ de 1 μ g/ml o menos, como se midió mediante FACS;

(8) inhibe parcialmente, como máximo, la fijación del ligando GITR a GITR en linfocitos T activados

(9) se fija a un epítipo conformacional en GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4), por ejemplo, un epítipo discontinuo en las secuencias de aminoácidos PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) y CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218);

(10) se fija a GITR humano glucosilado y no glucosilado ligado a O y ligado a N

(11) tiene actividad agonista en ausencia de la fijación a un receptor Fc, pero en donde la fijación a un receptor Fc también mejora la actividad agonista; y

(12) compete en cualquier dirección o en ambas direcciones, para fijarse a GITR humano, con 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 y 6G10.

Se proporcionan también anticuerpos anti-GITR que comprenden VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VLCDR1, VLCDR2 y/o VLCDR3 que difieren de CDR correspondiente de 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 y/o 6G10 en 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 cambios de aminoácidos (es decir, sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos). En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR comprende 1-5 cambios de aminoácidos en cada una de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR con respecto a la secuencia correspondiente en 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 y/o 6G10. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR comprende un total de 1-5 cambios de aminoácidos en todas las CDR con respecto a las CDR en 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 y/o 6G10.

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR comprende CDR de VH y VL que consisten en aquellas de 28F3, en donde uno o más de los aminoácidos

en una o más CDR son aquellos de uno de los otros anticuerpos anti-GITR descritos en la presente.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR comprende VHCDR1 que comprende una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a SYGMH (SEQ ID NO: 20) y puede comprender, por ejemplo, una de las siguientes secuencias degeneradas:

SYGXH (SEQ ID NO: 372), en donde X es cualquier aminoácido, por ejemplo, M o F;

X₁YGX₂H, en donde X₁ es cualquier aminoácido, por ejemplo, S, N o D; y X₂ es cualquier aminoácido, por ejemplo, M o F; y

X₁YGX₂X₃, en donde X₁ es cualquier aminoácido, por ejemplo, S, N o D; X₂ es cualquier aminoácido, por ejemplo, M o F, y X₃ es cualquier aminoácido, por ejemplo, H o Q.

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR comprende VHCDR2 que comprende una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a VIWYEGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 21) y puede comprender una de las siguientes secuencias degeneradas:

VIWYX₁GSNKX₂YADSVKG (SEQ ID NO: 373), en donde X₁ es cualquier aminoácido, por ejemplo, E o A; y X₂ es cualquier aminoácido, por ejemplo, Y o F; y

VIWYX₁GSNKX₂YX₃DSVKG (SEQ ID NO: 374), en donde X₁ es cualquier aminoácido, por ejemplo, E, A, G o D; X₂ es cualquier aminoácido, por ejemplo, Y o F; y X₃ es cualquier aminoácido, por ejemplo, A o V.

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR comprende VHCDR3 que comprende una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a GGSMVRGDYYYGMDV (SEQ ID NO: 22) y puede comprender, por ejemplo, una de las siguientes secuencias degeneradas:

GGSX₁VRGDYYYGMDV (SEQ ID NO: 375), en donde X₁ es cualquier aminoácido, por ejemplo, M o V, L, I o A.

GGSX₁VRGX₂YYYGMDV (SEQ ID NO: 376), en donde X₁ es cualquier aminoácido, por ejemplo, M o V, L, I o A; y X₂ es cualquier aminoácido, por ejemplo, D o E. Se establecen combinaciones particulares de X₁ y X₂ en los ejemplos.

GG (6-7aa) MDVWYX₁MDVW (SEQ ID NO: 377), en donde X₁ es cualquier aminoácido, por ejemplo, G, S o V. En algunas formas de realización, los 6-7 aminoácidos corresponden a los aminoácidos en esa posición en una secuencia VHCDR3 de un anticuerpo anti-GITR descrito en la presente.

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR comprende VLCDR1 que comprende una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a RASQGISSALA (SEQ ID NO: 23) y puede comprender, por ejemplo, una de las siguientes secuencias degeneradas:

RASQGISSXLA (SEQ ID NO: 378), en donde X es cualquier aminoácido, por ejemplo, A o W (o A, W o Y); y

RASQG (2-3 aa) SX₁LA (SEQ ID NO: 379), en donde X₁ es cualquier aminoácido, por ejemplo, W, Y o A, y los 2-3 aminoácidos son cualquier aminoácido, por ejemplo, GI, SVS o SVT.

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR comprende VLCDR2 que comprende una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a DASSLES (SEQ ID NO: 24) y puede comprender, por ejemplo, una de las siguientes secuencias degeneradas:

DASSLXS (SEQ ID NO: 380), en donde X es cualquier aminoácido, por ejemplo, E o Q; y

X₁ASSX₂X₃X₄, en donde X₁ es cualquier aminoácido, por ejemplo, A, D o G; X₂ es cualquier aminoácido, por ejemplo, L o R; X₃ es cualquier aminoácido, por ejemplo, Q, E o A; y X₄ es cualquier aminoácido, por ejemplo, S o T.

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR comprende VLCDR3 que comprende una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a QQFNSYPYT (SEQ ID NO: 25) y puede comprender, por ejemplo, una de las siguientes secuencias degeneradas:

QQXNSYPYT (SEQ ID NO: 381), en donde X es cualquier aminoácido, por ejemplo, F o Y; y

QQX₁X₂SX₃PX₄T (SEQ ID NO: 382), en donde X₁ es cualquier aminoácido, por ejemplo, F o Y; X₂ es cualquier aminoácido, por ejemplo, N o G; X₃ es cualquier aminoácido, por ejemplo, Y o S; y X₄ es cualquier aminoácido, por ejemplo, Y, W, I, P o Q.

Los anticuerpos que tienen secuencias homólogas a aquellas de 28F3, 3C3, 2G6, 8A6, 9G7, 14E3, 19H8, 19D3, 18E10 y/o 6G10, por ejemplo, las regiones V_H y V_L de SEQ ID NO: 13, 26, 39, 52, 71, 84, 97, 115, 128, y 335, y SEQ ID NO: 14, 27, 40, 53, 54, 72, 85, 98, 99, 116, 129, 130 y 336, respectivamente, o las cadenas pesadas y livianas de SEQ ID NO: 15, 17, 18, 28, 30, 31, 41, 43, 44, 55, 58, 59, 73, 75, 76, 86, 88, 89, 100, 102, 103, 117, 119, 120, 131, 134, 135 y 337, y SEQ ID NO: 16, 19, 29, 32, 42, 45, 56, 60, 61, 74, 87, 90, 101, 104, 105, 118, 121, 132, 133, 136, 137 y 338,

respectivamente, o las CDR se pueden obtener mediante mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NO: 147, 154, 158, 162, 168, 172, 176, 182, 186, 353 y/o SEQ ID NO: 148, 155, 159, 163, 164, 169, 173, 177, 178, 183, 187, 188, 354 o SEQ ID NO: 149, 151, 152, 156, 160, 165, 170, 174, 179, 184, 189, 355 y/o SEQ ID NO: 150, 153, 157, 161, 166, 171, 175, 180, 185, 190, 191, 356, luego se evalúa el anticuerpo alterado codificado para determinar la función retenida (es decir, las funciones que se indican en (1) a (12) anteriormente) usando los ensayos funcionales descritos en la presente.

V. Anticuerpos con modificaciones conservadoras

Los anticuerpos anti-GITR pueden comprender una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de la cadena liviana que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en donde una o más de estas secuencias CDR comprenden secuencias de aminoácidos específicas en función de los anticuerpos preferidos descritos en la presente (por ejemplo, 28F3, 19D3, 18E10, 3C3, 2G6, 8A6, 9G7, 14E3, 19H8 y 6G10), o modificaciones conservadoras de aquellos, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-GITR descritos en la presente. En consecuencia, un anticuerpo anti-GITR aislado, o una porción de fijación al antígeno de este, pueden comprender una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de la cadena liviana que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en donde:

(a) la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, 35, 48, 64, 80, 93, 108, 124, 140 y 344, y modificaciones conservadoras de aquellos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 sustituciones conservadoras de aminoácidos;

(b) la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, 38, 51, 67, 70, 83, 96, 111, 114, 127, 143, 146 y 347, y modificaciones conservadoras de aquellos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 sustituciones conservadoras de aminoácidos;

(c) el anticuerpo se fija específicamente a GITR, y

(d) el anticuerpo exhibe 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o todas de las

siguientes propiedades funcionales:

(1) se fija a GITR humano soluble, por ejemplo, con una K_D de 10 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se midió mediante Biacore;

(2) se fija a GITR humano unido a la membrana, por ejemplo, con una K_D de 1 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 1 nM), por ejemplo, como se midió mediante Scatchard;

(3) se fija a GITR humano unido a la membrana, por ejemplo, con un EC_{50} de 1 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 1 nM), por ejemplo, como se midió mediante FACS;

(4) fijarse a GITR de *Macaca fascicularis*, por ejemplo, se fija a GITR de *Macaca fascicularis* unido a la membrana, por ejemplo, con un EC_{50} de 10 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se midió mediante FACS;

(5) induce o mejora la activación de linfocitos T, tal como en presencia del acoplamiento CD3 (por ejemplo, en presencia de concentraciones anti-CD3 subóptimas), como se demostró mediante (i) el aumento de la producción de IL-2 y/o IFN- γ en linfocitos T que expresan GITR y/o (ii) la mejora en la proliferación de linfocitos T;

(6) induce o mejora la activación de linfocitos T sin requerir la reticulación multivalente;

(7) inhibe la fijación del ligando GITR a GITR en células 3A9-hGITR, por ejemplo, con un EC_{50} de 1 μ g/ml o menos, como se midió mediante FACS;

(8) inhibe parcialmente, como máximo, la fijación del ligando GITR a GITR en linfocitos T activados;

(9) se fija a un epítipo conformacional en GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4), por ejemplo, un epítipo discontinuo en las secuencias de aminoácidos PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) y CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218);

(10) se fija a GITR humano glucosilado y no glucosilado ligado a O y ligado a N;

(11) tiene actividad agonista en ausencia de la fijación a un receptor Fc, pero en donde la fijación a un receptor Fc también mejora la actividad agonista;

y

(12) compite en cualquier dirección o en ambas direcciones, para fijarse

a GTR humano, con 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 y/o 6G10.

En una forma de realización preferida, la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, 34, 47, 63, 79, 92, 107, 123, 139 y 343, y modificaciones conservadoras de aquellos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 sustituciones conservadoras de aminoácidos; y la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, 37, 50, 66, 69, 82, 95, 110, 113, 126, 142, 145 y 346, y modificaciones conservadoras de aquellos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 sustituciones conservadoras de aminoácidos. En otra forma de realización preferida, la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, 33, 46, 62, 78, 91, 106, 122, 138 y 342, y modificaciones conservadoras de aquellos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 sustituciones conservadoras de aminoácidos; y la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, 36, 49, 65, 68, 81, 94, 109, 112, 125, 141, 144 y 345, y modificaciones conservadoras de aquellos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 sustituciones conservadoras de aminoácidos.

En diversas formas de realización, el anticuerpo puede exhibir una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o todas las propiedades funcionales enumeradas en (1) a (12) anteriormente. Estos anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos también se pueden realizar en porciones de los anticuerpos excepto, o además de, las CDR. Por ejemplo, las modificaciones conservadoras de aminoácidos se pueden realizar en una región marco o en la región Fc. Una región variable o una cadena pesada o liviana pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 o 1-50 sustituciones conservadoras de aminoácidos con respecto a las secuencias del anticuerpo anti-GTR que se proporcionan en la presente. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GTR comprende una combinación de modificaciones conservadoras y

no conservadoras de aminoácidos.

VI. Anticuerpos que se fijan al mismo epítopo de GITR que los anticuerpos descritos en la presente, o que compiten con estos para fijarse a GITR

Asimismo, se proporcionan anticuerpos que compiten, para fijarse a GITR, con los anticuerpos anti-GITR particulares descritos en la presente (por ejemplo, anticuerpos 28F3, 19D3, 18E10, 3C3, 2G6, 8A6, 9G7, 14E3, 19H8 y 6G10). Estos anticuerpos de competencia se pueden identificar en función de su capacidad para inhibir competitivamente la fijación a GITR de uno o más anticuerpos monoclonales 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 y 6G10 en ensayos estándares de fijación a GITR. Por ejemplo, se pueden usar ensayos ELISA estándares o ensayos ELISA competitivos en donde una proteína de GITR humano recombinante se inmoviliza en la placa, se agregan diversas concentraciones de un primer anticuerpo no etiquetado, se lava la placa, se agrega un segundo anticuerpo etiquetado y se mide la cantidad de etiquetas. Si la concentración creciente del (primer) anticuerpo no etiquetado (también denominado “anticuerpo de bloqueo”) inhibe la fijación del (segundo) anticuerpo etiquetado, se considera que el primer anticuerpo inhibe la fijación del segundo anticuerpo a la diana en la placa, o se considera que compite con la fijación del segundo anticuerpo. De manera adicional o alternativa, el análisis BIAcore se puede usar para evaluar la capacidad de los anticuerpos para competir. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la fijación de un anticuerpo anti-GITR descrito en la presente a GITR demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con el anticuerpo para fijarse a GITR.

En consecuencia, en la presente se proporcionan anticuerpos anti-GITR que inhiben la fijación de anticuerpos anti-GITR descritos en la presente a GITR en células, por ejemplo, linfocitos T activados, en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, y/o cuya fijación a GITR en células, por ejemplo, linfocitos T activados, se inhibe en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% , por ejemplo, como se midió mediante ELISA o FACS, usando el ensayo descrito en el siguiente párrafo.

Un experimento de competencia de ejemplo para determinar, por ejemplo, si un primer anticuerpo bloquea la fijación de (es decir, “compite con”) un segundo anticuerpo, se puede realizar de la siguiente manera: se preparan linfocitos T humanos

activados de la siguiente manera: Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aíslan de la sangre humana usando gradiente Ficoll y se activan con 10µg/ml de fitohemaglutinina (PHA-L) (USBiol#P3370-30) y 200IU/ml de IL-2 recombinante (Peprotech#200-02) durante 3 días. Los linfocitos T activados se vuelven a suspender en amortiguador FACS (PBS con 5 % de suero bovino fetal) y se sembraron a 10^5 células por cavidad de muestra en una placa de 96 cavidades. Se coloca la placa en hielo, y luego se agrega el primer anticuerpo no conjugado en concentraciones que varían de 0 a 50 µg/ml (titulación triple a partir de una concentración más alta de 50 µg/ml). Se puede usar IgG no relacionada como control de isotipo para el primer anticuerpo, y se puede agregarla en las mismas concentraciones (titulación triple a partir de una concentración más alta de 50µg/ml). Se puede incluir un segundo anticuerpo de muestra no etiquetado e incubado previamente con 50µg/ml como control positivo para el bloqueo completo (100 % de inhibición) y se puede usar una muestra sin el anticuerpo en la incubación primaria como control negativo (sin competencia; 0 % de inhibición). Después de 30 minutos de incubación, se agrega un segundo anticuerpo etiquetado, por ejemplo, biotinilado, en una concentración de 2µg/ml por cavidad sin lavar. Las muestras se incubaron durante 30 minutos más en hielo. Se retiran los anticuerpos no unidos, lavando las células con amortiguador FACS. Un segundo anticuerpo etiquetado unido a la célula se detecta con un agente que detecta la etiqueta, por ejemplo, estreptavidina conjugada con PE (Invitrogen, catalog#S21388) para detectar biotina. Las muestras se obtienen en un citómetro de flujo FACS Calibur (BD, San José) y se analizan con el software Flowjo (Tree Star, Inc, Ashland, OR). Los resultados se pueden representar como el % de inhibición (es decir, restando del 100 % la cantidad de etiqueta en cada concentración dividida por la cantidad de etiqueta obtenida sin un anticuerpo de bloqueo). En general, el mismo experimento se realiza luego en sentido inverso, es decir, el primer anticuerpo es el segundo anticuerpo, y el segundo anticuerpo es el primer anticuerpo. En algunas formas de realización, un anticuerpo, al menos parcialmente (por ejemplo, al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%) o totalmente (100 %), bloquea la fijación de otro anticuerpo a la diana, por ejemplo, GITR humano o una porción de este, y sin importar si la inhibición ocurre cuando uno o el otro anticuerpo es el primer anticuerpo. Un primer y un segundo anticuerpo "bloquean de manera cruzada" la fijación entre sí a la diana, cuando los anticuerpos compiten entre sí en ambos sentidos, es decir, en experimentos de competencia en donde el primer anticuerpo se agrega primero y en experimentos de competencia en donde el segundo

anticuerpo se agrega primero. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR se fijan al mismo epítipo que el de los anticuerpos anti-GITR descritos en la presente (por ejemplo, anticuerpos 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 y 6G10), por ejemplo, como se determinó mediante una técnica de mapeo de epítopos determinada. Como se analiza en la presente, el anticuerpo 28F3 se fija en una región en GITR humano en QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGE (SEQ ID NO: 215). En consecuencia, en algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR se fija a residuos de aminoácidos en la región QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGE (SEQ ID NO: 215), correspondiente a residuos de aminoácidos 1-39 de GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4). En una forma de realización, el anticuerpo anti-GITR se fija a residuos de aminoácidos en la región QRPTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 216) de GITR humano maduro. En una forma de realización, los anticuerpos anti-GITR descritos en la presente se fijan a residuos de aminoácidos en la región PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) y CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218) de GITR humano maduro. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR se fijan a secuencias de aminoácidos PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) y CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218), como se determinó mediante HDX, por ejemplo, usando el protocolo establecido en los ejemplos.

Las técnicas para determinar los anticuerpos que se fijan al "mismo epítipo en GITR" con los anticuerpos descritos en la presente incluyen, por ejemplo, métodos de mapeo de epítopos, tales como, análisis de rayos X de cristales de complejos antígeno:anticuerpo que proporcionan resolución atómica del epítipo. Otros métodos controlan la fijación del anticuerpo a los fragmentos de antígeno o variaciones mutadas del antígeno donde la pérdida de la fijación debido a una modificación de un residuo de aminoácido dentro de la secuencia de antígenos a menudo se consideran como una indicación de un componente de epítipo. Además, los métodos computacionales combinados para el mapeo de epítopos también se pueden usar. Los métodos también dependen de la capacidad de un anticuerpo de interés para aislar por afinidad péptidos cortos específicos (ya sea en forma tridimensional nativa o en forma desnaturalizada) de colecciones combinadas de péptidos de expresión en fago. Los péptidos luego se toman como ejemplo para la definición del epítipo correspondiente al anticuerpo usado para analizar la colección de péptidos. Para el mapeo de epítopos, también se desarrollaron algoritmos computacionales que se mostraron para mapear

epítopos discontinuos conformacionales.

Los anticuerpos que compiten por la fijación con los anticuerpos anti-GITR descritos en la presente, o que se fijan al mismo epítipo que estos, se pueden identificar usando métodos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, los ratones se pueden inmunizar con GITR humano, como se describe en la presente, se pueden producir hibridomas, y los anticuerpos monoclonales resultantes se pueden analizar para determinar la capacidad de competir con un anticuerpo descrito en la presente para fijarse a GITR. Los ratones también se pueden inmunizar con un fragmento más pequeño de GITR que contiene el epítipo al cual el anticuerpo se fija. El epítipo o la región que comprende el epítipo se pueden ubicar mediante, por ejemplo, el análisis para la fijación a una serie de péptidos superpuestos que abarcan GITR. De manera alternativa, el método de Jaspers *et al.*, *Biotechnology* 12:899, 1994, se puede usar para guiar la selección de anticuerpos que tienen el mismo epítipo y, por lo tanto, propiedades similares al anticuerpo anti-GITR descrito en la presente. Si se usa la expresión en fago, en primer lugar, la cadena pesada del anticuerpo anti-GITR se usa junto con un repertorio de cadenas livianas (preferentemente, humanas) para seleccionar un anticuerpo unido a GITR, y luego, la cadena liviana nueva se usa junto un repertorio de cadenas pesadas (preferentemente, humanas) para seleccionar un anticuerpo unido a GITR (preferentemente, humano) que tiene el mismo epítipo o la misma región del epítipo como un anticuerpo anti-GITR descrito en la presente. De manera alternativa, se pueden obtener variantes de un anticuerpo descrito en la presente mediante mutagénesis de cADN que codifica las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo.

También se puede usar mutagénesis por barrido de alanina, según se describe en Cunningham y Wells (1989) *Science* 244: 1081-1085, o cualquier otra forma de mutagénesis de punto de residuos de aminoácidos en GITR para determinar el epítipo funcional para un anticuerpo anti-GITR. Sin embargo, los estudios de mutagénesis pueden también revelar residuos de aminoácidos que son esenciales para la estructura tridimensional total de GITR pero que no participan directamente en los contactos anticuerpo-antígeno, y por lo tanto, se pueden necesitar otros métodos para confirmar un epítipo funcional que se determina usando este método.

El epítipo o la región del epítipo (una “región del epítipo” es una región que comprende el epítipo o que se superpone con el epítipo) unidos por un anticuerpo específico también se pueden determinar evaluando la fijación del anticuerpo a péptidos que comprenden fragmentos de GITR, por ejemplo, fragmentos no

desnaturalizados o desnaturalizados. Una serie de péptidos superpuestos que comprenden la secuencia de GTR (por ejemplo, GTR humano) se pueden sintetizar y analizar para la fijación, por ejemplo, en ELISA directo, ELISA competitivo (en donde el péptido se evalúa por su capacidad de prevenir la fijación de un anticuerpo a GTR unido a una cavidad de una placa de microtitulación), o en un chip. Estos métodos de análisis de péptidos pueden no tener la capacidad de detectar algunos epítomos funcionales discontinuos, es decir, epítomos funcionales que incluyen residuos de aminoácidos que no son contiguos en la secuencia primaria de la cadena de polipéptidos de GTR.

También se puede identificar un epítomo mediante el análisis de proteínas a base de MS, tal como espectrometría de masa del intercambio hidrógeno/deuterio (HDX-MS) y oxidación fotoquímica rápida de proteínas (FPOP). HDX-MS se puede realizar, por ejemplo, como se describe en los ejemplos y en Wei et al. (2014) *Drug Discovery Today* 19:95, cuyos métodos se incorporan específicamente por referencia en la presente. FPOP se puede realizar como se describió, por ejemplo, en Hambley y Gross (2005) *J. American Soc. Mass Spectrometry* 16:2057, cuyos métodos se incorporan específicamente por referencia en la presente.

El epítomo unido mediante anticuerpos anti-GTR también se puede determinar mediante métodos estructurales, tales como determinación de estructura de cristal de rayos X (por ejemplo, WO2005/044853), modelo molecular y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), que incluye determinación por RMN de las velocidades de intercambio H-D de hidrógenos de amida lábiles en GTR cuando están libres y cuando están unidos en un complejo con un anticuerpo de interés (Zinn-Justin *et al.* (1992) *Biochemistry* 31, 11335-11347; Zinn-Justin *et al.* (1993) *Biochemistry* 32, 6884-6891).

Con respecto a la cristalografía de rayos X, la cristalización se puede lograr usando cualquiera de los métodos conocidos en el estado de la técnica (por ejemplo, Giege *et al.* (1994) *Acta Crystallogr.* D50:339-350; McPherson (1990) *Eur. J. Biochem.* 189:1-23), que incluyen microbatch (por ejemplo, Chayen (1997) *Structure* 5:1269-1274), difusión de vapor por gota colgante (por ejemplo McPherson (1976) *J. Biol. Chem.* 251:6300-6303), siembra y diálisis. Es conveniente usar una preparación de proteínas que tenga una concentración de al menos alrededor de 1 mg/ml y, preferentemente, de alrededor de 10 mg/ml a alrededor de 20 mg/ml. La cristalización se puede lograr mejor en una solución precipitante que contiene polietilenglicol 1000-20,000 (PEG; peso molecular promedio que varía de alrededor de 1000 a alrededor de

20.000 Da), preferentemente, de alrededor de 5000 a alrededor de 7000 Da, con mayor preferencia, de alrededor de 6000 Da, con concentraciones que varían de alrededor de 10 % a alrededor de 30 % (w/v). También puede ser conveniente incluir un agente estabilizante de proteína, por ejemplo, glicerol, en una concentración que varía de alrededor de 0,5 % a alrededor de 20 %. Una sal adecuada, tal como cloruro de sodio, cloruro de litio o citrato de sodio también puede ser conveniente en la solución precipitante, preferentemente, en una concentración que varía de alrededor de 1 mM a alrededor de 1000 mM. El precipitante se amortigua, preferentemente, a un pH de alrededor de 3,0 a alrededor de 5,0, preferentemente, alrededor de 4,0. Los amortiguadores específicos útiles en la solución precipitante pueden variar y son conocidos en el estado de la técnica (Scopes, *Protein Purification: Principles y Practice*, tercera edición, (1994) Springer-Verlag, Nueva York). Algunos ejemplos de amortiguadores útiles incluyen, entre otros, HEPES, Tris, MES y acetato. Los cristales se pueden cultivar en un amplio rango de temperaturas, que incluyen 2 °C, 4 °C, 8 °C y 26 °C.

Los cristales de anticuerpo:antígeno se pueden estudiar usando técnicas de difracción de rayos X conocidas y se pueden refinar por medio de software informático, tal como X-PLOR (Yale University, 1992, distribuido por Molecular Simulations, Inc.; véase, por ejemplo, Blundell & Johnson (1985) *Meth. Enzymol.* 114 & 115, H. W. Wyckoff *et al.*, ed., Academic Press; publicación de la solicitud de patente estadounidense N.º 2004/0014194) y BUSTER (Bricogne (1993) *Acta Cryst.* D49:37-60; Bricogne (1997) *Meth. Enzymol.* 276A:361-423, Carter & Sweet, ed.; Roversi *et al.* (2000) *Acta Cryst.* D56:1313-1323), cuyas descripciones se incorporan en su totalidad en la presente por referencia.

Los anticuerpos anti-GITR se pueden fijar al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos anti-GITR que tienen la secuencia de aminoácidos descrita en la presente, como se determinó mediante una técnica de mapeo de epítopos, tal como una técnica descrita en la presente.

VII. Anticuerpos modificados y sometidos a ingeniería genética

Regiones VH y VL

También se proporcionan anticuerpos modificados y modificados por ingeniería genética que pueden prepararse mediante un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias V_H y/o V_L descritas en la presente como material de inicio para diseñar un anticuerpo modificado, que puede tener propiedades alteradas del anticuerpo de inicio.

Un anticuerpo se puede someter a ingeniería genética modificando uno o más residuos en una o ambas regiones variables (es decir, V_H y/o V_L), por ejemplo, en una o más regiones CDR y/o en una o más regiones marco. De manera adicional o alternativa, un anticuerpo se puede someter a ingeniería genética modificando los residuos en las regiones constantes, por ejemplo, para alterar las funciones efectoras del anticuerpo.

Un tipo de modificación por ingeniería genética de la región variable que se puede realizar es el injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con los antígenos diana predominantemente a través de los residuos de aminoácidos que se ubican en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada y la cadena liviana. Por ello, las secuencias de aminoácidos en las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que en las secuencias fuera de las CDR. Dado que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos naturales específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo natural específico injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Véanse. EE. UU.* 86:10029-10033; la patente estadounidense N.º 5,225,539 otorgada a Winter, y las patentes estadounidenses N.ºs 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 otorgadas a Queen *et al.*)

En consecuencia, otra forma de realización descrita en la presente se relaciona con un anticuerpo monoclonal aislado o una porción de fijación al antígeno de este, que comprende una región variable de la cadena pesada, que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 20, 33, 46, 62, 78, 91, 106, 122, 138 y 342, SEQ ID NO: 21, 34, 47, 63, 79, 92, 107, 123, 139 y 343, y SEQ ID NO: 22, 35, 48, 64, 80, 93, 108, 124, 140 y 344, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana, que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 23, 36, 49, 65, 68, 81, 94, 109, 112, 125, 141, 144 y 345, SEQ ID NO: 24, 37, 50, 66, 69, 82, 95, 110, 113, 126, 142, 145 y 346, y SEQ ID NO: 25, 38, 51, 67, 70, 83, 96, 111, 114, 127, 143, 146 y 347, respectivamente. Por lo tanto, esos anticuerpos contienen las secuencias CDR de V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales 28F3,

19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 y 6G10, y aun así pueden contener diferentes secuencias marco de estos anticuerpos.

Dichas secuencias marco se pueden obtener de bases de datos de ADN públicas o de referencias publicadas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos germinales. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para los genes de las regiones variables de la cadena pesada y cadena liviana humanas se pueden hallar en la base de datos de la secuencia de la línea germinal humana "VBase" (disponible en Internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase) y en Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH publicación N.º 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; y Cox, J. P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; los contenidos de cada uno se incorporan expresamente en la presente por referencia.

Las secuencias marco preferidas para usar en los anticuerpos descritos en la presente son aquellas estructuralmente similares a las secuencias marco usadas por los anticuerpos descritos en la presente. Las secuencias CDR1, 2 y 3 de V_H y las secuencias CDR1, 2 y 3 de V_L se pueden injertar en regiones marco que tienen una secuencia idéntica a la que se halla en el gen de inmunoglobulina de la línea germinal del que deriva la secuencia marco, o las secuencias CDR se pueden injertar en las regiones marco que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha descubierto que, en algunos casos, es conveniente mutar los residuos en las regiones marco para mantener o mejorar la capacidad de fijación al antígeno del anticuerpo (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.os 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 otorgadas a Queen *et al.*).

Los anticuerpos sometidos a ingeniería genética descritos en la presente incluyen aquellos en los que se realizaron modificaciones en los residuos marco en V_H y/o V_L, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. En general, las modificaciones del marco se realizan para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un método consiste en "retromutar" uno o más residuos marco a la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que se sometió a mutación somática puede contener residuos marco que difieren de la secuencia de la línea germinal de la que deriva el anticuerpo. Los

residuos se pueden identificar comparando las secuencias marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de la que deriva el anticuerpo. Para regresar las secuencias de la región marco a la configuración de su línea germinal, las mutaciones somáticas se pueden “retromutar” a la secuencia de la línea germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR. Esos anticuerpos “retromutados” también están incluidos.

Otro tipo de modificación del marco implica la mutación de uno o más residuos en la región marco, o incluso en una o más regiones CDR, para eliminar los epítopos de los linfocitos T y así reducir la posible inmunogenicidad del anticuerpo. Este enfoque también se denomina "desinmunización" y se describe en mayor detalle en la publicación de patente estadounidense N.º 20030153043 por Carr *et al.*

Otro tipo de modificación de la región variable es mutar residuos de aminoácidos en las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3, V_H y/o V_L, para así mejorar una o más propiedades de fijación (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés. Se puede realizar mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR para introducir las mutaciones, y se puede evaluar el efecto de la fijación del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, mediante ensayos *in vitro* o *in vivo*, como se describe en la presente y se indica en los ejemplos. Preferentemente, se introducen modificaciones conservadoras (como se analiza más adelante). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos, pero preferentemente son sustituciones. Asimismo, por lo general, no se alteran más de 1, 2, 3, 4 o 5 residuos en una región CDR.

En consecuencia, también se proporcionan anticuerpos monoclonales anti-GITR aislados, o porciones de estos de fijación al antígeno, que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende: (a) una región CDR1 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 20, 33, 46, 62, 78, 91, 106, 122, 138 y 342, o una secuencia de aminoácidos que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 20, 33, 46, 62, 78, 91, 106, 122, 138 y 342; (b) una región CDR2 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, 34, 47, 63, 79, 92, 107, 123, 139 y 343, o una secuencia de aminoácidos que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 21, 34, 47, 63, 79, 92, 107, 123, 139 y 343; (c) una región CDR3 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 22,

35, 48, 64, 80, 93, 108, 124, 140 y 344, o una secuencia de aminoácidos que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 22, 35, 48, 64, 80, 93, 108, 124, 140 y 344; (c) una región CDR1 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 23, 36, 49, 65, 68, 81, 94, 109, 112, 125, 141, 144 y 345, o una secuencia de aminoácidos que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 23, 36, 49, 65, 68, 81, 94, 109, 112, 125, 141, 144 y 345; (e) una región CDR2 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24, 37, 50, 66, 69, 82, 95, 110, 113, 126, 142, 145 y 346, o una secuencia de aminoácidos que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 24, 37, 50, 66, 69, 82, 95, 110, 113, 126, 142, 145 y 346; y (f) una región CDR3 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 25, 38, 51, 67, 70, 83, 96, 111, 114, 127, 143, 146 y 347, o una secuencia de aminoácidos que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 25, 38, 51, 67, 70, 83, 96, 111, 114, 127, 143, 146 y 347.

Los residuos de metionina en las CDR de anticuerpos se pueden oxidar, lo que podría provocar una degradación química y la consecuente reducción de la potencia del anticuerpo. En consecuencia, también se proporcionan anticuerpos anti-GITR que tienen uno o más residuos de metionina en las CDR de la cadena pesada y/o liviana reemplazados por residuos de aminoácidos que no se someten a degradación oxidativa. En una forma de realización, los residuos de metionina en las CDR de los anticuerpos 28F3, 18E10, 19D3 y 6G10 se reemplazan por residuos de aminoácidos que no se someten a degradación oxidativa.

De manera similar, los sitios de desamidación se pueden eliminar de los anticuerpos anti-GITR, particularmente, en las CDR.

Fc y Fc modificados

Las regiones variables de anti-GITR descritas en la presente pueden estar ligadas (por ejemplo, ligadas de manera covalente o fusionadas) a un Fc, por ejemplo, un Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, que puede ser de cualquier alotipo o isoalotipo, por ejemplo, para IgG1: G1m, G1m1(a), G1m2(x), G1m3(f), G1m17(z); para IgG2: G2m, G2m23(n); para IgG3: G3m, G3m21(g1), G3m28(g5), G3m11(b0), G3m5(b1), G3m13(b3), G3m14(b4), G3m10(b5), G3m15(s), G3m16(t), G3m6(c3), G3m24(c5),

G3m26(u), G3m27(v); y para K: Km, Km1, Km2, Km3 (véase, por ejemplo, Jefferies et al. (2009) mAbs 1:1).

En algunas formas de realización, las regiones variables de anti-GITR descritas en la presente están ligadas a un Fc que se fija a uno o más receptores activadores Fc (Fcγ1, Fcγ1a o Fcγ1b), y por ende estimulan ADCC y pueden causar la reducción de linfocitos T. En algunas formas de realización, las regiones variables de anti-GITR descritas en la presente están ligadas a un Fc que causa reducción. Como se describe adicionalmente en los ejemplos (Ejemplos 16 y 17), los isotipos IgG2a de ratón e IgG2b de rata (equivalentes a IgG2a de ratón en la fijación a FcR activadores de ratón) indujeron la mayor inhibición del crecimiento tumoral en varios modelos de tumor en ratones. Los isotipos mG2a, mG2b y rG2b de anti-GITR casi no tuvieron efecto en las poblaciones de Treg o indujeron escasos aumentos de estas en la periferia, mientras que indujeron una reducción de Treg considerable en el entorno tumoral, lo cual se correlacionó con la inhibición del crecimiento tumoral. En cambio, el isotipo mIgG2a causó un aumento en el porcentaje de linfocitos CD8+ en el sitio del tumor, mientras que mIgG1 e IgG2b de rata no causaron ningún aumento, o solo un aumento mínimo, en el porcentaje de linfocitos CD8+. En consecuencia, en algunas formas de realización, las regiones variables de anti-GITR descritas en la presente están ligadas a un Fc de IgG1 o IgG3 humanas, es decir, los anticuerpos son del isotipo IgG1 o IgG3. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR son anticuerpos reductores, en particular, reducen los linfocitos T_{reg} que están en el microentorno tumoral (y por lo tanto, mejoran la actividad antitumoral), pero no reducen considerablemente los linfocitos T_{eff} que están en el microentorno tumoral y median el efecto antitumoral, y/o no reducen considerablemente los linfocitos T_{reg} y T_{eff} que están fuera del tumor, por ejemplo, en la periferia. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR son de un isotipo (ya sea un isotipo natural o no natural (por ejemplo, que incluye una o más mutaciones), que estimula la reducción de linfocitos T_{reg} o la eliminación en el sitio del tumor y la activación concomitante de linfocitos T_{eff} . En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR crean una relación T_{eff} con respecto a T_{reg} elevada en el sitio del tumor, lo cual indica una fuerte actividad antitumoral, y preferentemente, sin reducir de manera considerable los linfocitos T_{reg} y T_{eff} que están fuera del tumor, por ejemplo, en la periferia. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR bloquean la actividad inmunosupresora de Treg. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR tienen un receptor Fc con poca o ninguna fijación a FcR, por ejemplo, una fijación reducida a FcR activadores.

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR tienen un Fc que se fija o tienen mejor fijación a FcRIIb, lo que puede proporcionar un agonismo mejorado.

En algunas formas de realización, la potencia de un anticuerpo anti-GITR para potenciar una respuesta inmunitaria endógena es mejorada, optimizada o maximizada mediante un método que comprende seleccionar, diseñar o modificar la región Fc del anticuerpo para mejorar la fijación de dicha región Fc a un receptor Fc activador. En una forma de realización, el anticuerpo anti-GITR es TRX-518.

En algunas formas de realización, las regiones variables de anti-GITR descritas en la presente están ligadas a Fc no efectores o prácticamente no efectores, por ejemplo, IgG2 o IgG4.

Las regiones variables de anti-GITR descritas en la presente pueden estar ligadas a una región Fc no natural, por ejemplo, un Fc no efector o un Fc con mejor fijación a uno o más receptores Fc activadores (FcγI, FcγIIa o FcγIIIa), a fin de mejorar la reducción de T_{reg} en el entorno tumoral.

En general, las regiones variables descritas en la presente pueden estar ligadas a un Fc que comprende una o más modificaciones, generalmente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como semivida sérica, fijación al complemento, fijación al receptor Fc y/o citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, un anticuerpo descrito en la presente se puede modificar químicamente (por ejemplo, se pueden unir una o más porciones químicas al anticuerpo) o se puede modificar para alterar su glucosilación, para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas formas de realización se describe en mayor detalle más adelante. La numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU de Kabat.

La región Fc abarca dominios derivados de la región constante de una inmunoglobulina, preferentemente, una inmunoglobulina humana, que incluye un fragmento, un análogo, una variante, un mutante o un derivado de la región constante. Las inmunoglobulinas adecuadas incluyen IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y otras clases, tales como IgA, IgD, IgE e IgM. La región constante de una inmunoglobulina se define como un polipéptido natural o producido en forma sintética, homólogo a la región del terminal C de la inmunoglobulina, y puede incluir un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 o un dominio CH4, en forma separada o en combinación.

La región constante de una inmunoglobulina es responsable de muchas funciones importantes del anticuerpo, que incluyen la fijación al receptor Fc (FcR) y la fijación al complemento. Existen cinco clases principales de región constante de la

cadena pesada, clasificadas como IgA, IgG, IgD, IgE, IgM, cada una de ellas con funciones efectoras características, designadas por el isotipo. Por ejemplo, la IgG se separa en cuatro subclases conocidas como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Las moléculas de Ig interactúan con múltiples clases de receptores celulares. Por ejemplo, las moléculas de IgG interactúan con tres clases de receptores Fcγ (FcγR) específicos para la clase de anticuerpo IgG, por ejemplo, FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Se informó que las secuencias importantes para la fijación de IgG a los receptores FcγR se ubican en los dominios CH2 y CH3. La semivida sérica de un anticuerpo es influenciada por la capacidad de ese anticuerpo de fijarse a un receptor Fc (FcR).

En algunas formas de realización, la región Fc es una región Fc variante, por ejemplo, una secuencia de Fc que fue modificada (por ejemplo, mediante sustitución, eliminación y/o inserción de aminoácidos) con respecto a una secuencia de Fc (por ejemplo, un polipéptido Fc no modificado que se modifica posteriormente para generar una variante), a fin de proporcionar características estructurales convenientes y/o actividad biológica.

Por ejemplo, se pueden realizar modificaciones en la región Fc, a fin de generar una variante de Fc que (a) tenga mayor o menor citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), (b) mayor o menor citotoxicidad mediada por el complemento (CDC), (c) tenga mayor o menor afinidad a C1q y/o (d) tenga mayor o menor afinidad a un receptor Fc con respecto al Fc nativo. Tales variantes de la región Fc comprenden, en general, al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. Es particularmente conveniente combinar modificaciones de aminoácidos. Por ejemplo, la región Fc variante puede incluir 2, 3, 4, 5, etc. sustituciones en ella, por ejemplo, de las posiciones específicas de la región Fc identificadas en la presente.

Una región Fc variante también puede comprender una alteración de secuencia, en donde los aminoácidos que participan en la formación del puente de disulfuro se eliminan o se reemplazan por otros aminoácidos. Esa eliminación puede evitar la reacción con otras proteínas que contienen cisteína presentes en la célula huésped utilizada para producir los anticuerpos descritos en la presente. Aun cuando se eliminan los residuos de cisteína, los dominios Fc de la cadena simple pueden formar un dominio Fc dimérico que se mantiene unido de manera no covalente. En otras formas de realización, la región Fc se puede modificar para hacerla más compatible con una célula huésped seleccionada. Por ejemplo, se puede eliminar la secuencia de PA cerca del terminal N de una región Fc nativa típica, que puede ser

reconocida por una enzima digestiva en *E. coli*, tal como la prolina iminopeptidasa. En otras formas de realización, se pueden eliminar uno o más sitio de glucosilación dentro del dominio Fc. Los residuos que son generalmente glucosilados (por ejemplo, asparagina) pueden conferir una respuesta citolítica. Tales residuos se pueden eliminar o sustituir por residuos no glucosilados (por ejemplo, alanina). En otras formas de realización, los sitios que participan en la interacción con el complemento, tales como el sitio de fijación a C1q, se pueden eliminar de la región Fc. Por ejemplo, se puede eliminar o sustituir la secuencia EKK de la IgG1 humana. En algunas formas de realización, los sitios que afectan la fijación a los receptores Fc se pueden eliminar, preferentemente, aquellos que no son sitios de fijación al receptor de rescate. En otras formas de realización, una región Fc se puede modificar para eliminar un sitio ADCC. En el estado de la técnica se conocen los sitios ADCC; véase, por ejemplo, Molec. Immunol. 29 (5): 633-9 (1992) con respecto a los sitios ADCC en IgG1. Algunos ejemplos específicos de los dominios Fc variantes se describen, por ejemplo, en WO 97/34631 y WO 96/32478.

En una forma de realización, la región bisagra de Fc se modifica de manera que se altere, por ejemplo, aumente o disminuya, la cantidad de residuos de cisteína en la región bisagra. Este enfoque también se describe en la patente estadounidense N.º 5.677.425 de Bodmer *et al.* La cantidad de residuos de cisteína en la región bisagra de Fc se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamble de las cadenas pesadas y livianas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo. En una forma de realización, se muta la región bisagra Fc de un anticuerpo para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de interfase del dominio CH2-CH3 del fragmento bisagra Fc, de manera que el anticuerpo tenga una fijación deficiente de proteína A de *Staphylococcy* (*SpA*) con respecto a la fijación de *SpA* al dominio bisagra Fc natural. Este enfoque se describen en mayor detalle en la patente estadounidense N.º 6.165.745 de Ward *et al.*

Aun en otras formas de realización, la región Fc se altera mediante el reemplazo de, al menos, un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden reemplazar uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 por un residuo de aminoácido diferente, de manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada para un ligando efector, pero retenga la capacidad de fijación al antígeno del anticuerpo de origen. El ligando efector

al cual se le altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque también se describe en mayor detalle en las patentes estadounidenses 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter *et al.*

En otro ejemplo, se pueden reemplazar uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 329, 331 y 322 por un residuo de aminoácido diferente, de manera que el anticuerpo presente una alteración de la fijación a C1q y/o una reducción o eliminación de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este enfoque se describe en mayor detalle en la patente estadounidense N.º 6.194.551 de Idusogie *et al.*

En otro ejemplo, se alteran uno o más residuos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 231 y 239 para así alterar la capacidad del anticuerpo para fijarse al complemento. Este enfoque se describe en mayor detalle en la publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer *et al.*

Aun en otro ejemplo, la región Fc se puede modificar para aumentar la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o para aumentar la afinidad a un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 313, 315, 320, 322, 324, 325, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 433, 434, 435, 436, 437, 438 o 439. Algunos ejemplos de sustitución incluyen 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D y 332E. Algunos ejemplos de variantes incluyen 239D/332E, 236A/332E, 236A/239D/332E, 268F/324T, 267E/268F, 267E/324T y 267E/268F/324T. Otras modificaciones para mejorar FcγR y las interacciones del complemento incluyen, entre otras, las sustituciones 298A, 333A, 334A, 326A, 247I, 339D, 339Q, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 305I y 396L. Estas y otras modificaciones se revisan en Strohl, 2009, *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691.

Las modificaciones de Fc que aumentan la fijación a un receptor Fcγ incluyen modificaciones de aminoácidos en una o más de las posiciones de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 279, 280, 283, 285, 298, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 312, 315, 324, 327, 329, 330, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 379, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc, en donde la numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU, como se describe en Kabat

(WO00/42072).

Otras modificaciones de Fc que se pueden realizar a los Fc son las que se hacen para reducir o eliminar la fijación a FcγR y/o proteínas del complemento, y así reducir o eliminar las funciones efectoras mediadas por Fc, tales como ADCC, ADCP y CDC. Los ejemplos de modificaciones incluyen, entre otros, sustituciones, inserciones y eliminaciones en las posiciones 234, 235, 236, 237, 267, 269, 325 y 328, en donde la numeración se realiza de acuerdo con el índice EU. Algunos ejemplos de sustituciones incluyen, entre otros, 234G, 235G, 236R, 237K, 267R, 269R, 325L y 328R, en donde la numeración se realiza de acuerdo con el índice EU. Una variante de Fc puede comprender 236R/328R. Otras modificaciones para reducir las interacciones de FcγR y complemento incluyen las sustituciones 297A, 234A, 235A, 237A, 318A, 228P, 236E, 268Q, 309L, 330S, 331 S, 220S, 226S, 229S, 238S, 233P y 234V, además de la eliminación de la glucosilación en la posición 297 por medios enzimáticos o de mutación, o mediante la producción en organismos, tales como bacterias que no glucosilan proteínas. Estas y otras modificaciones se revisan en Strohl, 2009, *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691.

De manera opcional, la región Fc puede comprender un residuo de aminoácido no natural en posiciones adicionales y/o alternativas conocidas por la persona del oficio de nivel medio (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.^{os} 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; 6,194,551; 7,317,091; 8,101,720; las publicaciones de patente PCT WO 00/42072; WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925 y WO 06/020114).

También se pueden usar variantes de Fc que mejoran la afinidad a un receptor FcγRIIb inhibidor. Esas variantes pueden proporcionar a una proteína de fusión Fc actividades inmunomoduladoras relacionadas con células FcγRIIb⁺, que incluyen, por ejemplo, linfocitos B y monocitos. En una forma de realización, las variantes de Fc proporcionan mejor afinidad selectiva a FcγRIIb con respecto a uno o más receptores activadores. Las modificaciones para alterar la fijación a FcγRIIb incluyen una o más modificaciones en una posición seleccionada del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 y 332, de acuerdo con el índice EU. Algunos ejemplos de sustituciones para mejorar la afinidad a FcγRIIb incluyen, entre otras, 234D, 234E, 234F, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y y 332E. Algunos ejemplos de sustituciones incluyen 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D,

268E, 328F, 328W y 328Y. Otras variantes de Fc para mejorar la fijación a FcγRIIb incluyen 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 267E/268D, 267E/268E y 267E/328F.

Las afinidades y las propiedades de fijación de una región Fc para su ligando se pueden determinar mediante distintos métodos de ensayo *in vitro* (ensayos bioquímicos o inmunológicos) conocidos en el estado de la técnica, que incluyen, entre otros, métodos de equilibrio (por ejemplo, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA)) o cinética (por ejemplo, análisis BIACORE), y otros métodos, tales como ensayos de fijación indirecta, ensayos de inhibición competitiva, transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET), electroforesis en gel y cromatografía (por ejemplo, filtración en gel). Estos y otros métodos pueden utilizar una etiqueta en uno o más de los componentes que se examinan y/o emplear distintos métodos de detección, que incluyen, entre otros, etiquetas cromogénicas, fluorescentes, luminiscentes o isotópicas. Se puede hallar una descripción detallada de afinidades de fijación y cinética en Paul, W. E., ed., *Fundamental Immunology*, 4.^a ed., Lippincott-Raven, Filadelfia (1999), que se centra en las interacciones anticuerpo-inmunogen.

En algunas formas de realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Varios enfoques son posibles. Por ejemplo, esto se puede realizar aumentando la afinidad de fijación de la región Fc a FcRn. Por ejemplo, uno o más de los siguientes residuos se pueden mutar: 252, 254, 256, 433, 435, 436, como se describe en la patente estadounidense N.º 6,277,375. Los ejemplos específicos de sustituciones incluyen una o más de las siguientes: T252L, T254S y/o T256F. Alternativamente, para aumentar la semivida, se puede alterar el anticuerpo dentro de la región CH1 o CL de manera que contenga un epítipo de fijación al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de IgG, como se describe en las patentes estadounidenses N.ºs 5,869,046 y 6,121,022 de Presta *et. al.* Otros ejemplos de variantes que aumentan la fijación a FcRn y/o mejoran las propiedades farmacocinéticas incluyen sustituciones en las posiciones 259, 308, 428 y 434, que incluyen, por ejemplo, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y y 434M. Otras variantes que aumentan la fijación de Fc a FcRn incluyen: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton et al., 2004, *J. Biol. Chem.* 279(8): 6213-6216, Hinton et al. 2006 *Journal of Immunology* 176:346-356), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 307Q, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields et al, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(9):6591-6604), 252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R,

256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 311S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 308T/309P/311S (Dall'Acqua et al. *Journal of Immunology*, 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua et al., 2006, *Journal of Biological Chemistry* 281:23514-23524). Otras modificaciones para modular la fijación a FcRn se describen en Yeung et al., 2010, *J Immunol*, 182:7663-7671. En algunas formas de realización, se pueden usar isotipos de IgG híbridos con características biológicas particulares. Por ejemplo, una variante híbrida de 1gG1/1gG3 se puede construir sustituyendo las posiciones de 1gG1 en la región CH2 y/o CH3 con los aminoácidos de 1gG3 en las posiciones en donde los dos isótopos difieren. Por lo tanto, se puede construir una variante híbrida del anticuerpo IgG que comprenda una o más sustituciones, por ejemplo, 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R y 436F. En otras formas de realización descritas en la presente, se puede construir una variante híbrida de 1gG1/1gG2 sustituyendo las posiciones de IgG2 en la región CH2 y/o CH3 con aminoácidos de 1gG1 en las posiciones en donde los dos isótopos difieren. Por lo tanto, se puede construir una variante híbrida del anticuerpo IgG que comprenda una o más sustituciones, por ejemplo, una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 233E, 234L, 235L, -236G (en referencia a la inserción de una glicina en la posición 236) y 327A.

Además, los sitios de fijación en IgG1 humana para FcγR1, FcγR2, FcγR3 y FcRn se mapearon, y se describieron variantes con fijación mejorada (véase Shields et al. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Se demostró que las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoran la fijación a FcγR3. Además, se demostró que las siguientes combinaciones de mutantes mejoran la fijación a FcγR3: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A, lo cual se mostró para exhibir mejor fijación a FcγR3a y actividad de ADCC (Shields et al., 2001). Se identificaron otras variantes de IgG1 con una fijación mucho mejor a FcγR3a, que incluyen variantes con mutaciones de S239D/I332E y S239D/I332E/A330L, las cuales mostraron el mayor aumento en afinidad a FcγR3a, una disminución en la fijación a FcγR2b y una fuerte actividad citotóxica en *Macaca fascicularis* (Lazar et al., 2006). La introducción de las mutaciones triples en anticuerpos, tales como alemtuzumab (específico de CD52), trastuzumab (específico de HER2/neu), rituximab (específico de CD20) y cetuximab (específico de EGFR) implicó una considerable mejora de la actividad de ADCC *in vitro*, y la variante de S239D/I332E mostró una mejor capacidad para eliminar los linfocitos B en monos (Lazar et al., 2006). Asimismo, se identificaron mutantes de IgG1

que contenían mutaciones L235V, F243L, R292P, Y300L y P396L que exhibieron una mejor afinidad a FcγRIIIa y, al mismo tiempo, mejor actividad de ADCC en ratones transgénicos que expresaban FcγRIIIa humano en modelos de cáncer de linfocitos B y cáncer de mama (Stavenhagen *et al.*, 2007; Nordstrom *et al.*, 2011). Otros mutantes de Fc que se pueden usar incluyen: S298A/E333A/L334A, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, L235V/F243L/R292P/Y300L/ P396L y M428L/N434S.

En algunas formas de realización, se elige un Fc que tiene menor fijación a FcγR. Un ejemplo de Fc, por ejemplo, Fc de IgG1, con menor fijación a FcγR comprende las siguientes tres sustituciones de aminoácidos: L234A, L235E y G237A.

En algunas formas de realización, se elige un Fc que tiene menor fijación al complemento. Un ejemplo de Fc, por ejemplo, Fc de IgG1, con menor fijación al complemento tiene las siguientes dos sustituciones de aminoácidos: A330S y P331S.

En algunas formas de realización, se elige un Fc que esencialmente no tiene función efectora, es decir, tiene menos fijación a FcγR y menos fijación al complemento. Un ejemplo de Fc, por ejemplo, Fc de IgG1, que es no efectora comprende las siguientes mutaciones: L234A, L235E, G237A, A330S y P331S. Los ejemplos de cadenas pesadas que comprenden estas mutaciones se indican en la Tabla 11.

Cuando se usa un dominio constante de IgG4, generalmente es preferible incluir la sustitución S228P, que imita la secuencia bisagra en IgG1 y así estabiliza las moléculas de IgG4.

Aun en otra forma de realización, se modifica la glucosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede obtener un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). La glucosilación se puede alterar, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo al antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, mediante la alteración de uno o más sitios de glucosilación en la secuencia de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glucosilación de marco de región variable, para así eliminar la glucosilación en ese sitio. La aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo al antígeno. Ese enfoque se describe en mayor detalle en las patentes estadounidenses N.^{os} 5.714.350 y 6.350.861 de Co *et al.*

La glucosilación de la región constante en N297 se puede evitar mutando el residuo N297 a otro residuo, por ejemplo, N297A, y/o mutando un aminoácido adyacente, por ejemplo, 298, para reducir así la glucosilación en N297.

De manera adicional o alternativa, se puede obtener un anticuerpo que tenga un tipo de glucosilación alterada, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga una menor cantidad de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tenga más estructuras GlcNac bisectrices. Se demostró que dichos patrones de glucosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Las modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, mediante la expresión del anticuerpo en una célula huésped que tenga una maquinaria de glucosilación alterada. Las células que tienen una maquinaria de glucosilación alterada se describieron en el estado de la técnica y se pueden usar como células huésped para expresar en ellas anticuerpos recombinantes descritos en la presente, para así producir un anticuerpo con glucosilación alterada. Por ejemplo, EP 1.176.195 de Hanai *et al.* describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosil transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en esa línea celular exhiban hipofucosilación. La publicación de PCT WO 03/035835 de Presta describe una variante de la línea celular CHO, células Lec13, con una menor capacidad de unir fucosa a los carbohidratos ligados a Asn(297), lo cual también da como resultado la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa línea celular (véase también Shields, R.L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). La publicación de PCT WO 99/54342 de Umana *et al.* describe líneas celulares modificadas por ingeniería genética para expresar glucosiltransferasas modificadoras de glucoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas por ingeniería genética muestren más estructuras GlcNac bisectrices, lo cual da como resultado una mayor actividad de ADCC de los anticuerpos (véase también Umana *et al.*, (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180).

Otra modificación de los anticuerpos descrita en la presente es pegilación. Un anticuerpo se puede pegar, por ejemplo, para aumentar la semivida biológica (por ejemplo, suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o un fragmento de este, se hace reaccionar, por lo general, con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento del anticuerpo. Con preferencia, la pegilación se realiza mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero hidrosoluble reactivo análogo). Como se usa en la presente, la expresión “polietilenglicol” pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se usaron para derivatizar otras proteínas, tales

como mono (C1-C10) alcoxi- o ariloxi-poli(etilenglicol) o poli(etilenglicol)-maleimida. En algunas formas de realización, el anticuerpo que se pegilará es un anticuerpo aglucosilado. Los métodos para pegar proteínas se conocen en el estado de la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos descritos en la presente. Véanse, por ejemplo, EP 0 154 316 de Nishimura *et al.* y EP 0 401 384 de Ishikawa *et al.*

VIII. Propiedades físicas de los anticuerpos

Los anticuerpos descritos en la presente pueden contener uno o más sitios de glucosilación en la región variable de la cadena liviana o pesada. Tales sitios de glucosilación pueden dar como resultado un aumento de la inmunogenicidad del anticuerpo o una alteración de la pK del anticuerpo debido a la fijación alterada al antígeno (Marshall *et al.* (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala y Morrison (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick *et al.* (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al.* (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.* (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Se sabe que la glucosilación se produce en los motivos que contienen una secuencia N-X-S/T. En algunos casos, se prefiere un anticuerpo anti-GITR que no contenga glucosilación en la región variable. Esto se puede lograr seleccionando anticuerpos que no contienen el motivo de glucosilación en la región variable o mutando residuos en la región de glucosilación.

En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente no contienen sitios de isomerismo de asparagina. La desamidación de asparagina se puede producir en secuencias N-G o D-G y puede dar como resultado la creación de un residuo de ácido isoaspártico que introduce un pliegue en la cadena de polipéptidos y disminuye su estabilidad (efecto del ácido isoaspártico).

Cada anticuerpo tendrá un punto isoeléctrico único (pI), que a menudo se encuentra en el rango de pH 6 a 9,5. A menudo, el pH de un anticuerpo IgG1 se encuentra en el rango de pH de 7-9,5, y el pI de un anticuerpo IgG4 se encuentra en el rango de pH de 6-8. Existen conjeturas con respecto a que los anticuerpos con un pI fuera del rango normal pueden presentar desplegamiento e inestabilidad en condiciones *in vivo*. Por ello, es preferible tener un anticuerpo anti-GITR que contenga un valor pI que se encuentre dentro del rango normal. Esto puede lograrse seleccionando anticuerpos con un pI en el rango normal o mutando residuos de superficie cargada.

Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión característica, con una temperatura de fusión más alta que indica una mayor estabilidad *in vivo* general

(Krishnamurthy R y Manning M C (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). En general, se prefiere que la T_{M1} (la temperatura del desplegamiento inicial) sea mayor a 60 °C, preferentemente, mayor a 65 °C, aun con mayor preferencia, mayor a 70 °C. El punto de fusión de un anticuerpo se puede medir usando calorimetría diferencial de barrido (Chen et al (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando et al (1999) *Immunol Lett* 68:47-52) o dicroísmo circular (Murray et al. (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

En una forma de realización preferida, se seleccionan anticuerpos que no se degradan rápidamente. La degradación de un anticuerpo se puede medir usando electroforesis capilar (CE) y MALDI-MS (Alexander A J y Hughes D E (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

En otra forma de realización preferida, se seleccionan anticuerpos que tienen efectos de agregabilidad mínimos, lo cual puede desencadenar una respuesta inmunitaria no deseada y/o propiedades farmacocinéticas alteradas o desfavorables. En general, son aceptables los anticuerpos que tienen una agregabilidad de 25 % o menos, preferentemente, 20 % o menos, aun con mayor preferencia, 15% o menos, aun con mayor preferencia, 10 % o menos y, aun con mayor preferencia, 5 % o menos. La agregabilidad se puede medir mediante distintas técnicas, que incluyen columna de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y dispersión de luz.

IX. Métodos para modificar anticuerpos por ingeniería genética

Como se analizó anteriormente, los anticuerpos anti-GITR que tienen las secuencias V_H y V_L descritas en la presente se pueden usar para crear nuevos anticuerpos anti-GITR modificando las secuencias V_H y/o V_L o las regiones constantes unidas a estas. Por eso, en otro aspecto descrito en la presente, las características estructurales de un anticuerpo anti-GITR descrito en la presente, por ejemplo, 28F3, 19D3, 18E10, 3C3, 2G6, 8A6, 9G7, 14E3, 19H8 y 6G10, se usan para crear anticuerpos anti-GITR estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos descritos en la presente, tales como fijación a GITR humano y GITR de *Macaca fascicularis*. Por ejemplo, una o más regiones CDR de 28F3, 19D3, 18E10, 3C3, 2G6, 8A6, 9G7, 14E3, 19H8 y 6G10, o mutaciones de estas, se pueden combinar de manera recombinante con regiones marco y/u otras CDR para crear anticuerpos anti-GITR adicionales modificados de manera recombinante por ingeniería genética descritos en la presente, como se analizó anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen aquellas descritas en la sección

anterior. El material de inicio para el método de modificación por ingeniería genética es uno o más de las secuencias V_H y/o V_L proporcionadas en la presente, o una o más regiones CDR de estas. Para crear el anticuerpo modificado por ingeniería genética, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias V_H y/o V_L que se proporcionan en la presente, o una o más de sus regiones CDR. En cambio, la información contenida en las secuencias se usa como material de inicio para crear una secuencia de “segunda generación” derivada de las secuencias originales, y luego, las secuencias de “segunda generación” se preparan y se expresan como una proteína.

En consecuencia, en la presente se proporcionan métodos para preparar un anticuerpo anti-GITR que comprende:

(a) proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 20, 33, 46, 62, 78, 91, 106, 122, 138 y 342, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, 34, 47, 63, 79, 92, 107, 123, 139 y 343, y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 22, 35, 48, 64, 80, 93, 108, 124, 140 y 344; y (ii) una secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 23, 36, 49, 65, 68, 81, 94, 109, 112, 125, 141, 144, y 345, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24, 37, 50, 66, 69, 82, 95, 110, 113, 126, 142, 145 y 346, y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 25, 38, 51, 67, 70, 83, 96, 111, 114, 127, 143, 146 y 347;

(b) alterar al menos un residuo de aminoácido dentro de la secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena pesada y/o la secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena liviana para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y

(c) expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

Se pueden usar técnicas de biología molecular estándares para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterada.

Preferentemente, el anticuerpo codificado por la secuencia de anticuerpo alterada es el que retiene una, algunas o la totalidad de las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-GITR descritos en la presente, que incluyen,

(1) fijarse a GITR humano soluble, por ejemplo, con una K_D de 10 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se midió mediante

Biacore;

(2) fijarse a GITR humano unido a la membrana, por ejemplo, con una K_D de 1 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 1 nM), por ejemplo, como se midió mediante Scatchard;

(3) fijarse a GITR humano unido a la membrana, por ejemplo, con un EC_{50} de 1 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 1 nM), por ejemplo, como se midió mediante FACS;

(4) fijarse a GITR de *Macaca fascicularis*, por ejemplo, fijarse a GITR de *Macaca fascicularis* unido a la membrana, por ejemplo, con un EC_{50} de 10 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se midió mediante FACS;

(5) inducir o mejorar la activación de linfocitos T, tal como en presencia del acoplamiento CD3 (por ejemplo, en presencia de concentraciones anti-CD3 subóptimas), como se demostró mediante (i) el aumento de la producción de IL-2 y/o IFN- γ en linfocitos T que expresan GITR y/o (ii) la mejora en la proliferación de linfocitos T;

(6) inducir o mejorar la activación de linfocitos T sin requerir la reticulación multivalente;

(7) inhibir la fijación del ligando GITR a GITR en células 3A9-hGITR, por ejemplo, con un EC_{50} de 1 μ g/ml o menos, como se midió mediante FACS;

(8) inhibir parcialmente, como máximo, la fijación del ligando GITR a GITR en linfocitos T activados;

(9) fijarse a un epítipo conformacional en GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4), por ejemplo, un epítipo discontinuo en las secuencias de aminoácidos PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) y CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218);

(10) fijarse a GITR humano glucosilado y no glucosilado ligado a O y ligado a N;

(11) tener actividad agonista en ausencia de la fijación a un receptor Fc, pero en donde la fijación a un receptor Fc también mejora la actividad agonista; y

(12) competir en cualquier dirección o en ambas direcciones, para fijarse a GITR humano, con 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 y/o 6G10.

El anticuerpo alterado puede exhibir una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, once o todas las propiedades funcionales indicadas en (1) a (12) anteriormente. Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados se pueden evaluar mediante ensayos estándares disponibles en el estado de la técnica y/o descritos en la presente, tales como los que se indican en los ejemplos (por ejemplo, ELISA, FACS).

En algunas formas de realización de los métodos para modificar anticuerpos por ingeniería genética descritos en la presente, se pueden introducir mutaciones de manera aleatoria o selectiva a lo largo de toda una secuencia que codifica el anticuerpo anti-GITR o en una parte de aquella, y los anticuerpos anti-GITR modificados resultantes se pueden analizar para determinar la actividad de fijación y/u otras propiedades funcionales descritas en la presente. Se han descrito métodos mutacionales en el estado de la técnica. Por ejemplo, la publicación PCT WO 02/092780 de Short describe métodos para crear y analizar mutaciones de anticuerpos mediante el uso de mutagénesis de saturación, ensamble de ligadura de síntesis, o una combinación de estos. De manera alternativa, la publicación PCT WO 03/074679 de Lazar *et al.* describe métodos de uso del análisis computacional para optimizar propiedades fisicoquímicas de anticuerpos.

X. Moléculas de ácidos nucleicos

Otro aspecto descrito en la presente se relaciona con las moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos descritos en la presente. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otras proteínas o ácidos nucleicos celulares (por ejemplo, ADN cromosómico, tal como el ADN cromosómico que está unido al ADN aislado en la naturaleza), mediante técnicas estándares, que incluyen el tratamiento con SDS/alcalino, bandas de CsCl, cromatografía en columna, enzimas de restricción, electroforesis en gel de agarosa y otras técnicas conocidas en el estado de la técnica. Véase, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico descrito en la presente puede ser, por ejemplo, ADN o ARN, y puede contener secuencias intrónicas o no. En algunas formas de realización preferidas, el ácido nucleico es una molécula de cADN.

Los ácidos nucleicos descritos en la presente se pueden obtener usando

técnicas de biología molecular estándares. En el caso de los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados de ratones transgénicos que tienen genes de inmunoglobulina humana como se describe más adelante), los cADN que codifican la cadena liviana y la cadena pesada del anticuerpo obtenido mediante el hibridoma se pueden obtener mediante técnicas estándares de amplificación por PCR o clonación de cADN. En el caso de los anticuerpos obtenidos de una genoteca de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de expresión en fago), un ácido nucleico que codifica el anticuerpo se puede recuperar de una genoteca.

Las moléculas de ácidos nucleicos preferidas descritas en la presente son aquellas que codifican las secuencias VH y VL de los anticuerpos monoclonales 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 y 6G10. Los ejemplos de secuencias de ADN que codifican las secuencias VH de 28F3, 19D3, 18E10, 3C3, 2G6, 8A6, 9G7, 14E3, 19H8 y 6G10 se indican en SEQ ID NO: 147, 154, 158, 162, 168, 172, 176, 182, 186 y 353, respectivamente. Los ejemplos de secuencias de ADN que codifican las secuencias VL de 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 y 6G10 se indican en SEQ ID NO: 148, 155, 163, 164, 169, 173, 177, 178, 183, 187, 188 y 354, respectivamente. Los ejemplos de ADN que codifican las secuencias de la cadena pesada de 28F3, 19D3, 18E10, 3C3 (3C3-1 y 3C3-2), 2G6, 8A6, 9G7 (9G7-1 y 9G7-2), 14E3, 19H8 (19H8-1 y 19H8-2) y 6G10 se indican en SEQ ID NO: 149, 156, 160, 165, 170, 174, 179, 184, 189 y 355, respectivamente. Los ejemplos de secuencias de ADN que codifican las secuencias de la cadena liviana de 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 y 6G10 se indican en SEQ ID NO: 150, 157, 161, 166, 167, 171, 175, 181, 180, 185, 190, 191 y 356, respectivamente.

Los ejemplos de ácidos nucleicos que codifican los dominios VH y VL maduros de los anticuerpos 28F3.IgG1 y 28F3.IgG1.1 (misma región variable) se indican en SEQ ID NO: 147 y 148, respectivamente. Los ejemplos de ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas maduras de los anticuerpos 28F3.IgG1 y 28F3.IgG1.1 se indican en SEQ ID NO: 151 y 152, respectivamente, y un ejemplo de ácido nucleico que codifica la cadena liviana madura de los anticuerpos 28F3.IgG1 y 28F3.IgG1.1 se indica en SEQ ID NO: 153.

Los ejemplos de dominios VH y VL de los anticuerpos 28F3.IgG1 y 28F3.IgG1.1 (misma región variable) con un péptido de señal se indican en SEQ ID NO: 357 y 358, respectivamente, y las secuencias de nucleótidos que las codifican se indican en SEQ ID NO: 359 y 360, respectivamente.

Los ejemplos de cadenas pesadas de los anticuerpos 28F3.IgG1 y 28F3.IgG1.1 con un péptido de señal se indican en SEQ ID NO: 361 y 362, respectivamente, y los ejemplos de secuencias de nucleótidos que las codifican se indican en SEQ ID NO: 363 y 364, respectivamente. Un ejemplo de cadena liviana de los anticuerpos 28F3.IgG1 y 28F3.IgG1.1 con un péptido de señal se indica en SEQ ID NO: 365, y un ejemplo de secuencia de nucleótidos que la codifica se indica en SEQ ID NO: 366.

Un método para elaborar 28F3.IgG1 puede comprender expresar la cadena pesada y las cadenas livianas en una línea celular que comprende las secuencias de nucleótidos que codifican las cadenas pesadas y livianas con un péptido de señal, por ejemplo, SEQ ID NO: 363 y 365, respectivamente. Un método para elaborar 28F3.IgG1.1 puede comprender expresar la cadena pesada y las cadenas livianas en una línea celular que comprende las secuencias de nucleótidos que codifican las cadenas pesadas y livianas con un péptido de señal, por ejemplo, SEQ ID NO: 364 y 366, respectivamente. La presente abarca las células huésped que comprenden estas secuencias de nucleótidos.

Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL, estos fragmentos de ADN también se pueden manipular mediante técnicas de ADN recombinante estándares, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en genes de la cadena de anticuerpos de longitud completa, en genes del fragmento Fab o en un gen scFv. En estas manipulaciones, el fragmento de ADN que codifica VL o VH se liga operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante del anticuerpo o un ligador flexible. Como se usa en este contexto, la expresión "ligado operativamente" significa que los dos fragmentos de ADN se unen de manera tal que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco.

El ADN aislado que codifica la región VH se puede convertir en un gen de la cadena pesada de longitud completa ligando operativamente el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de la cadena pesada (bisagra, CH1, CH2 y/o CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada se conocen en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al., (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH publicación N.º 91-3242), y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante la amplificación PCR estándar. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, por ejemplo, una

región de IgG1. Para un gen de la cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica V_H se puede ligar operativamente a otra molécula de ADN que codifica solo la región constante CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL se puede convertir en un gen de la cadena liviana de longitud completa (como un gen de la cadena liviana Fab) ligando operativamente el ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena liviana, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena liviana se conocen en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., *et al.* (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH publicación N.º 91-3242), y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante la amplificación PCR estándar. La región constante de la cadena liviana puede ser una región constante kappa o lambda.

Con el objetivo de crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se ligan operativamente a otro fragmento que codifica un ligador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de manera que las secuencias VH y VL se puedan expresar como una proteína de cadena simple contigua, con las regiones VL y VH unidas mediante el ligador flexible (véanse, por ejemplo, Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554).

En la presente también se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos que codifican secuencias VH y VL homólogas a las de los anticuerpos monoclonales 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 y 6G10. Los ejemplos de moléculas de ácidos nucleicos codifican secuencias VH y VL que son al menos 70 % idénticas, por ejemplo, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % idénticas, a las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las secuencias VH y VL de los anticuerpos monoclonales 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 y 6G10. En la presente también se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos con sustituciones conservadoras (es decir, sustituciones que no alteran las secuencias de aminoácidos resultantes después de la traducción de la molécula de ácido nucleico), por ejemplo, para la optimización de codones.

XI. Producción de anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales descritos en la presente se pueden producir

mediante distintas técnicas, tales como la técnica de hibridación celular somática estándar descrita en Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Si bien se prefieren los procedimientos de hibridación celular somática, en principio, también se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B, técnica de expresión en fago mediante el uso de colecciones de genes de anticuerpo humano.

El sistema de animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un proceso sólidamente establecido. Los protocolos de inmunización y las técnicas para aislar esplenocitos inmunizados con fines de fusión son conocidos en el estado de la técnica. Los socios de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión también son conocidos.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados descritos en la presente se pueden preparar en función de la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se describió anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de la cadena pesada y liviana se puede obtener del hibridoma murino de interés y se pueden modificar por ingeniería genética para que contengan secuencias de inmunoglobulina no murina (por ejemplo, humana) mediante el uso de técnicas de biología molecular estándares. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas se pueden ligar a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 4,816,567 otorgada a Cabilly *et al.*). Con el objetivo de crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas se pueden introducir en un marco humano usando métodos conocidos en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, la patentes estadounidense N.º 5,225,539 otorgada a Winter, y las patentes estadounidenses N.ºs 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 otorgadas a Queen *et al.*).

En una forma de realización, los anticuerpos descritos en la presente son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra GTR se pueden generar usando ratones transgénicos o transcromosómicos que tienen partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones que, en la presente, se denominan ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y en conjunto, “ratones de Ig humana”.

HuMAb mouse® (Medarex®, Inc.) contiene minilocus del gen de

inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina de la cadena pesada (μ y γ) y de la cadena liviana κ humana sin redistribución, junto con mutaciones dirigidas que inactivan el locus de las cadenas μ y κ endógeno (véase, por ejemplo, Lonberg *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). En consecuencia, los ratones muestran una expresión reducida de κ o IgM de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena pesada y liviana humanos introducidos se someten a un cambio de clase y mutación somática para generar IgG κ humana monoclonal con alta afinidad (Lonberg *et al.* (1994), *supra*; se hace una reseña en Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación y el uso de ratones HuMab, y las modificaciones genómicas realizadas por tales ratones, se describen adicionalmente en Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; y Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, cuyo contenido se incorpora específicamente en la presente por referencia en su totalidad. Véanse también las patentes estadounidenses N.^{os} 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; y 5,770,429; todas otorgadas a Lonberg y Kay; patente estadounidense N.^o 5,545,807 otorgada a Surani *et al.*; Publicación PCT N.^{os} WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas otorgadas a Lonberg y Kay; y publicación PCT N.^o WO 01/14424 otorgada a Korman *et al.*

En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente se obtienen usando un ratón que tiene secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tales como un ratón que tiene un transgén de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena liviana humana. Tales ratones, denominados en la presente “ratones KM”, se describen en detalle en la publicación PCT WO 02/43478 otorgada a Ishida *et al.*

Adicionalmente, existen sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana que están disponibles en el estado de la técnica y se pueden usar para obtener anticuerpos anti-GITR descritos en la presente. Por ejemplo, se puede usar un sistema transgénico alternativo denominado

Xenomouse (Abgenix, Inc.); esos ratones se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses N.^{os} 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6, 150,584 y 6,162,963 otorgadas a Kucherlapati *et al.*

Asimismo, existen sistemas de animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana que están disponibles en el estado de la técnica y se pueden usar para obtener anticuerpos anti-GITR descritos en la presente. Por ejemplo, se pueden usar ratones que tienen un transcromosoma humano de la cadena pesada y un transcromosoma humano de la cadena liviana, denominado "ratón TC"; esos ratones se describen en Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Además, se han descrito vacas que tienen transcromosomas humanos de la cadena pesada y liviana en el estado de la técnica (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894) y se pueden usar para obtener anticuerpos anti-GITR descritos en la presente.

Los sistemas de ratón adicionales descritos en el estado de la técnica para obtener anticuerpos humanos, por ejemplo, anticuerpos anti-GITR humanos, incluyen (i) el ratón VelocImmune® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), en el cual las regiones variables de la cadena pesada y liviana del ratón endógeno fueron reemplazadas, mediante recombinación homóloga, por regiones variables de la cadena pesada y liviana humanas, ligadas operativamente a las regiones constantes de ratón endógeno, de modo que se obtengan anticuerpos quiméricos (V humanos/C de ratón) en los ratones, y se conviertan posteriormente en anticuerpos completamente humanos usando técnicas de ADN humano recombinante; y (ii) el ratón MeMo® (Merus Biopharmaceuticals, Inc.), en el cual el ratón contiene regiones variables de la cadena pesada humana sin redistribución, pero una sola región variable de la cadena liviana común humana redistribuida. Esos ratones, y su uso para obtener anticuerpos, se describen, por ejemplo, en WO 2009/15777, US 2010/0069614, WO 2011/072204, WO 2011/097603, WO 2011/163311, WO 2011/163314, WO 2012/148873, US 2012/0070861 y US 2012/0073004.

Los anticuerpos monoclonales humanos descritos en la presente también se pueden preparar usando métodos de expresión en fago para analizar colecciones de genes de inmunoglobulina humana. Esos métodos de expresión en fago para aislar anticuerpos humanos se establecen en el estado de la técnica. Véanse, por ejemplo: las patentes estadounidenses N.^{os} 5,223,409; 5,403,484; y 5,571,698 otorgadas a Ladner *et al.*; las patentes estadounidenses N.^{os} 5,427,908 y 5,580,717 otorgadas a Dower *et al.*; las patentes estadounidenses N.^{os} 5,969,108 y 6,172,197 otorgadas a

McCafferty *et al.*; y las patentes estadounidenses N.^{os} 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 y 6,593,081 otorgadas a Griffiths *et al.*

Los anticuerpos monoclonales humanos descritos en la presente también se pueden preparar usando ratones SCID en los que se reconstituyeron células inmunitarias humanas, de manera que se puede generar una respuesta de anticuerpos humanos al momento de la inmunización. Esos ratones se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses N.^{os} 5,476,996 y 5,698,767 otorgadas a Wilson *et al.*

Inmunizaciones

Para generar anticuerpos completamente humanos a GTR, se pueden inmunizar ratones transgénicos o transcrómicos que contienen genes de inmunoglobulina humana (por ejemplo, ratones HCo12, HCo7 o KM), con una preparación purificada o enriquecida del antígeno GTR y/o de las células que expresan GTR, o un fragmento de estas, como se describió para otros antígenos, por ejemplo, según Lonberg *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 y WO 98/24884. De manera alternativa, los ratones se pueden inmunizar con ADN que codifica GTR humano o un fragmento de este. Preferentemente, los ratones tendrán de 6 a 16 semanas de vida en la primera infusión. Por ejemplo, una preparación purificada o enriquecida (5-50 µg) del antígeno GTR recombinante se puede usar para inmunizar los ratones HuMAb por vía intraperitoneal. En el caso de que las inmunizaciones que usan una preparación purificada o enriquecida del antígeno GTR no den como resultado anticuerpos, los ratones también se pueden inmunizar con células que expresan GTR, por ejemplo, una línea celular, para promover respuestas inmunitarias. Los ejemplos de líneas celulares incluyen líneas celulares CHO y Raji estables que sobreexpresan GTR.

La experiencia acumulativa con distintos antígenos mostró que los ratones transgénicos HuMAb responden mejor cuando son inmunizados inicialmente por vía intraperitoneal (IP) o subcutánea (SC) con antígeno en el adyuvante de Ribi, y luego con inmunizaciones IP/SC una vez cada dos semanas (hasta un total de 10) con antígeno en el adyuvante de Ribi. La respuesta inmunitaria se puede monitorear durante el transcurso del protocolo de inmunización con muestras de plasma que se obtienen mediante sangrados retroorbitales. El plasma se puede analizar mediante ELISA y FACS (como se describe a continuación), y los ratones con suficientes titulaciones de inmunoglobulina humana anti-GTR se pueden usar para fusiones. Los ratones pueden recibir un refuerzo de antígeno por vía intravenosa 3 días antes de su

sacrificio y de la extracción del bazo y los ganglios linfáticos. Se prevé que puede ser necesario realizar 2-3 fusiones para cada inmunización. Generalmente, se inmunizan de 6 a 24 ratones para cada antígeno. En general, se usan las cepas HCo7, HCo12 y KM. Además, los transgenes HCo7 y HCo12 se pueden reproducir juntos en un solo ratón que tiene dos transgenes de la cadena pesada humana diferentes (HCo7/HCo12).

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales a G1TR

Para generar hibridomas que produzcan anticuerpos monoclonales humanos descritos en la presente, se pueden aislar esplenocitos y/o células de nódulos linfáticos de ratones inmunizados, y fusionarlos a una línea celular inmortalizada adecuada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se pueden analizar para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, se pueden fusionar suspensiones unicelulares de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados, con células de mieloma de ratón no secretoras Sp2/0 (ATCC, CRL 1581) con 50 % de PEG. Las células se colocan en placas a aproximadamente 2×10^5 en una placa de microtitulación de fondo plano, y luego se incuban durante dos semanas en medio selectivo que contiene 10 % de suero FetalClone, 18 % de medio condicionado "653", 5 % de origen (IGEN), 4 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 5 mM de HEPES, 0,055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, 50 mg/ml de gentamicina y 1X HAT (Sigma). Después de aproximadamente dos semanas, las células se pueden cultivar en un medio en el que HAT se reemplaza por HT. Luego, las cavidades individuales se pueden analizar mediante ELISA para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales humanos IgM e IgG. Cuando se produce el crecimiento considerable del hibridoma, el medio se puede observar generalmente después de 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpo se pueden volver a colocar en placas, analizar nuevamente, y si se comprueba que aún contienen IgG humana, los anticuerpos monoclonales se pueden subclonar al menos dos veces mediante dilución limitante. Los subclones estables luego se pueden cultivar *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para la caracterización.

Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, se pueden cultivar hibridomas determinados en matraces agitadores de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía por afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, N.J.).

La IgG eluida se puede verificar mediante electroforesis en gel y cromatografía de líquidos de alta resolución para garantizar la calidad. La solución amortiguadora se puede intercambiar en PBS, y la concentración se puede determinar mediante OD280 usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales se pueden dividir en alícuotas y almacenar a -80 °C.

Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales a GITR

Los anticuerpos se pueden producir en un transfectoma de célula huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica conocidos en el estado de la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Por ejemplo, para expresar anticuerpos, o fragmentos de estos anticuerpos, los ADN que codifican cadenas livianas y pesadas de longitud parcial o completa se pueden obtener mediante técnicas de biología molecular estándares (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación de cADN mediante el uso de un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés), y los ADN se pueden introducir en los vectores de expresión, de modo que los genes están ligados operativamente a secuencias de control de la transcripción y de la traducción. En este contexto, la expresión "ligado operativamente" significa que un gen del anticuerpo se liga en un vector, de manera que las secuencias de control de la transcripción y de la traducción en el vector cumplen su función prevista de regular la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen de manera que sean compatibles con la célula huésped de expresión que se usa. El gen de la cadena liviana del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vectores separados, o ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante métodos estándares (por ejemplo, ligadura de sitios de restricción complementarios en el fragmento y el vector del gen del anticuerpo, o ligadura de extremo roto si no hay ningún sitio de restricción presente). Las regiones variables de la cadena liviana y pesada de los anticuerpos descritos en la presente se pueden usar para crear genes de anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolas en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de la cadena pesada y regiones constantes de la cadena liviana del isotipo deseado, de manera que el segmento V_H se ligue operativamente al segmento C_H en el vector y el segmento V_L se ligue operativamente al segmento C_L en el vector.

De manera adicional o alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpos de una célula huésped. El gen de la cadena del anticuerpo se puede clonar en el vector, de manera que el péptido de señal se ligue en el marco al terminal amino del gen de cadena de anticuerpos. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína que no es inmunoglobulina).

En algunos ejemplos de formas de realización, se pueden usar los siguientes péptidos de señal de las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo humano: MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 315); MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (SEQ ID NO: 321); MEFGNWNVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 327); MEFGLSWIFLAAILKGVQC (SEQ ID NO: 329); MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (SEQ ID NO: 333); MDMRVLAQLLGLLLLCFPGARC (SEQ ID NO: 323); MEAPAQLLFLLLLWLPDGTG (SEQ ID NO: 325); MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC (SEQ ID NO: 317); MRVLAQLLGLLLLCFPGARC (SEQ ID NO: 319); y METPAQLLFLLLLWLPDGTG (SEQ ID NO: 331).

Las cadenas pesadas y livianas de anticuerpos anti-GITR se pueden expresar con la secuencia de señal respectiva que estaba ligada a cada cadena en el hibridoma del cual se clonaron. A continuación se presentan las secuencias de señal de distintos anticuerpos anti-GITR presentes en el hibridoma del cual se clonaron, y dichas secuencias de señal se pueden usar para expresar el mismo anticuerpo u otro anticuerpo:

secuencia de señal de VH de 28F3:

MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 315)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT (SEQ ID NO: 316)

secuencia de señal de VL de 28F3:

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC (SEQ ID NO: 317)

ATGGACATGAGGGTCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCA
GGTGCCAGAT (SEQ ID NO: 318)

secuencia de señal de VH de 18E10:

MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 315)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT (SEQ ID NO: 316)

secuencia de señal de VL de 18H10:

MDMRVLAQLLGLLLLCFPGARC (SEQ ID NO: 317)

ATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTTTCCCAG
GTGCCAGAT (SEQ ID NO: 318)

secuencia de señal de VH de 19D3:

MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 315)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGT
GT (SEQ ID NO: 316)

secuencia de señal de VL de 19D3:

MRVLAQLLGLLLLCFPGARC (SEQ ID NO: 319)

ATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTTTCCCAGGTGCC
AGATGT (SEQ ID NO: 320)

secuencia de señal de VH de 3C3:

MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (SEQ ID NO: 321)

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGT
CC (SEQ ID NO: 322)

secuencia de señal de VL1 de 3C3:

MDMRVLAQLLGLLLLCFPGARC (SEQ ID NO: 323)

ATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTTTCCCAG
GTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 324)

secuencia de señal de VL2 de 3C3:

MEAPAQLLFLLLWLPDTTG (SEQ ID NO: 325)

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCA
CCGGA (SEQ ID NO: 326)

secuencia de señal de VH de 8A6:

MEFGLNWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 327)

ATGGAGTTTGGGCTGAACTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGT
GT (SEQ ID NO: 328)

secuencia de señal de VL de 8A6:

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC (SEQ ID NO: 317)

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCA
GGTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 318)

secuencia de señal de VH de 9G7:

MEFGLSWIFLAAILKGVQC (SEQ ID NO: 329)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGATTTTCCTTGCTGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTG
T (SEQ ID NO: 330)

secuencia de señal de VL1 y VL2 de 9G7:

METPAQLLFLLLLWLDPDTTG (SEQ ID NO: 331)

ATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCA
CCGGA (SEQ ID NO: 332)

secuencia de señal de VH de 14E3:

MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (SEQ ID NO: 333)

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGT
CC (SEQ ID NO: 334)

secuencia de señal de VL de 14E3:

MDMRVLAQLLGLLLLCFPGARC (SEQ ID NO: 323)

ATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTTTCCCAG
GTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 324)

secuencia de señal de VH de 19H8:

MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 315)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGT
GT (SEQ ID NO: 316)

secuencia de señal de VL1 de 19H8:

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC (SEQ ID NO: 317)

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCA
GGTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 318)

secuencia de señal de VL2 de 19H8:

MEAPAQLLFLLLLWLDPDTTG (SEQ ID NO: 325)

ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCA
CCGGA (SEQ ID NO: 326)

secuencia de señal de VH de 6G10:

MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 315)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGT
GT (SEQ ID NO: 316)

secuencia de señal de VL de 6G10:

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC (SEQ ID NO: 317)

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCA
GGTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 318)

La secuencia de señal MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO: 367) se puede
usar para expresar cadenas pesadas y livianas.

Las cadenas pesadas y livianas, o las porciones de estas, tales como las que

se proporcionan en la Tabla 11, pueden estar ligadas a una secuencia de señal proporcionada en la presente. Por ejemplo, la cadena pesada de 28F3 o su región variable, por ejemplo, que comprende SEQ ID NO: 13, 15, 17 o 18, puede estar ligada o fusionada a un péptido de señal que comprende o consiste en MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 315) o MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO: 367). La cadena liviana de 28F3 o su región variable, por ejemplo, que comprende SEQ ID NO: 14, 16 o 19, puede estar ligada o fusionada a un péptido de señal que comprende o consiste en MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC (SEQ ID NO: 317) o MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO: 367).

Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinante pueden tener secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula huésped. La expresión "secuencia reguladora" incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Esas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Las personas del oficio de nivel medio tendrán en cuenta que el diseño del vector de expresión, incluida la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores, tales como la elección de la célula huésped que se transformará, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de células huéspedes de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión proteica en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus del simio 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y poliovirus. De manera alternativa, se pueden usar secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de β -globina. Asimismo, se pueden usar elementos reguladores compuestos por secuencias de diferentes fuentes, tal como el sistema promotor SR α , que contiene secuencias del promotor temprano de SV40 y la repetición del terminal largo del virus de la leucemia humana de linfocitos T tipo 1 (Takebe, Y *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

Además de los genes de la cadena de anticuerpos y de las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes pueden tener secuencias adicionales, tales como las secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores

seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huéspedes en las que se introdujo el vector (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.^{os} 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, en general, el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se introdujo el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para usar en células huésped dhfr con amplificación/selección de metotrexato) y el gen neo (para la selección de G418).

Para la expresión de las cadenas liviana y pesada, los vectores de expresión que codifican las cadenas liviana y pesada se transfectan en una célula huésped mediante técnicas estándares. Las diversas formas del término "transfección" abarcan una amplia variedad de técnicas que se usan con frecuencia para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariótica o eucariótica, por ejemplo, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, transfección de DEAE-dextrano y similares. Si bien es posible, en teoría, expresar los anticuerpos descritos en la presente en células huésped procarióticas o eucarióticas, la expresión de los anticuerpos en las células eucarióticas y, con mayor preferencia, en las células huésped de mamíferos, es de máxima preferencia porque las células eucarióticas y, en particular, células de mamíferos son más susceptibles de agruparse y segregar un anticuerpo activo desde el punto de vista inmunológico y plegado adecuadamente, que las células procarióticas. Se informó que la expresión procariótica de genes de anticuerpo no es eficaz para la producción de altos niveles de anticuerpo activo (Boss, M. A. y Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Las células huésped de mamíferos que se prefieren para expresar los anticuerpos recombinantes descritos en la presente incluyen las de ovario de hámster chino (células CHO) (que incluyen células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 77:4216-4220, que se usan con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para usar con las células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión del gen GS descrito en WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338,841. Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpos se introducen en células huésped de mamíferos, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un período suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, con mayor preferencia, la

secreción del anticuerpo en el medio de cultivo donde se desarrollan las células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando métodos estándares de purificación de proteínas.

XII. Ensayos

Los anticuerpos descritos en la presente se pueden evaluar para determinar su fijación a GITR mediante, por ejemplo, ELISA estándar. En resumen, las placas de microtitulación se recubren con GITR purificado a 1-2 µg/ml en PBS, y luego se bloquean con 5 % de albúmina de suero bovino en PBS. Se agregan diluciones de anticuerpo (por ejemplo, diluciones de plasma de ratones inmunizados con GITR) a cada cavidad y se incuban durante 1-2 horas a 37 °C. Las placas se lavan con PBS/Tween y luego se incuban con reactivo secundario (por ejemplo, para anticuerpos humanos, un reactivo policlonal específico de Fc de IgG antihumana de cabra) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora a 37 °C. Después del lavado, las placas se desarrollan con sustrato de ABTS (Moss Inc, producto: ABTS-1000) y se analizan mediante un espectrofotómetro a OD 415-495. Luego, los sueros de ratones inmunizados se analizan también mediante citometría de flujo para fijarse a una línea celular que expresa GITR humano, pero no a una línea celular de control que no expresa GITR. En resumen, la fijación de anticuerpos anti-GITR se evalúa incubando células CHO que expresan GITR con el anticuerpo anti-GITR en una dilución 1:20. Las células se lavan, y se detecta la fijación con un Ab IgG antihumana etiquetada con PE. Los análisis de citometría de flujo se realizan mediante una citometría de flujo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Preferentemente, se usarán los ratones que desarrollen las mayores titulaciones para fusiones.

Se puede usar un ensayo ELISA, como se describió anteriormente, para evaluar anticuerpos y, por ende, hibridomas que producen anticuerpos que muestran reactividad positiva con el inmunogen GITR. Los hibridomas que producen anticuerpos que se fijan, preferentemente, con alta afinidad, a GITR luego se pueden subclonar y caracterizar adicionalmente. Un clon de cada hibridoma, que retiene la reactividad de las células de origen (según ELISA), luego se puede elegir para elaborar un banco de células y para la purificación del anticuerpo.

Para purificar anticuerpos anti-GITR, se pueden cultivar hibridomas determinados en matraces agitadores de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía por afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, NJ). La

IgG eluida se puede verificar mediante electroforesis en gel y cromatografía de líquidos de alta resolución para garantizar la calidad. La solución amortiguadora se puede intercambiar en PBS, y la concentración se puede determinar mediante OD₂₈₀ usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales se pueden dividir en alícuotas y almacenar a -80 °C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-GITR seleccionados se unen a epítomos únicos, cada anticuerpo se puede biotinilar usando reactivos disponibles en el comercio (Pierce, Rockford, IL). La fijación de MAb biotinilado se puede detectar con una sonda etiquetada con estreptavidina. Los estudios de competencia que usan anticuerpos monoclonales no etiquetados y anticuerpos monoclonales biotinilados se pueden realizar mediante el uso de placas de ELISA recubiertas con GITR como se describió anteriormente.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, se pueden realizar ELISA de isotipos mediante el uso de reactivos específicos para anticuerpos de un isotipo particular. Por ejemplo, para determinar el isotipo de un anticuerpo humano monoclonal, se pueden recubrir cavidades de placas de microtitulación con 1 µg/ml de inmunoglobulina antihumana durante la noche a 4 °C. Después de bloquear con 1 % de BSA, las placas se hacen reaccionar con 1 µg /ml o menos anticuerpos monoclonales de prueba o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante una o dos horas. Las cavidades luego se pueden hacer reaccionar con sondas conjugadas con fosfatasa alcalina específica de IgG1 humana o IgM humana. Las placas se desarrollan y se analizan como se describió anteriormente.

Para evaluar la fijación de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan GITR, se puede usar citometría de flujo, como se describió en los ejemplos. En resumen, las líneas celulares que expresan GITR unido a la membrana (cultivado en condiciones de crecimiento estándares) se mezclan con distintas concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contiene 0,1 % de BSA a 4 °C durante 1 hora. Después del lavado, las células se hacen reaccionar con anticuerpo anti-IgG etiquetado con fluoresceína en las mismas condiciones que la tinción del anticuerpo primario. Las muestras se pueden analizar mediante el instrumento FACScan usando luz y propiedades de dispersión lateral para la regulación de células simples, y se determina la fijación de los anticuerpos etiquetados. Se puede usar un ensayo alternativo que emplea microscopía de fluorescencia (en forma adicional o alternativa al ensayo de citometría de flujo). Las células se pueden teñir exactamente como se describió con anterioridad y se pueden examinar mediante microscopía de

fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, pero es posible que tenga menor sensibilidad en función de la densidad del antígeno.

Los anticuerpos anti-GITR se pueden evaluar también para determinar su reactividad con el antígeno GITR mediante transferencia Western. Brevemente, los extractos celulares de células que expresan GITR se pueden preparar y someterse a electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio y poliacrilamida. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transferirán a membranas de nitrocelulosa, bloqueadas con 20 % de suero de ratón y colocadas en sondas con los anticuerpos monoclonales que se deben evaluar. La fijación de IgG se puede detectar usando fosfatasa alcalina anti-IgG y se puede desarrollar con comprimidos de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Los métodos para analizar la afinidad de fijación, la reactividad cruzada y la cinética de fijación de distintos anticuerpos anti-GITR incluyen ensayos estándares conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR) Biacore™ con el uso del instrumento Biacore™ 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Suecia).

En una forma de realización, un anticuerpo se fija específicamente a la región extracelular de GITR humano. Un anticuerpo se puede fijar específicamente a un dominio particular (por ejemplo, un dominio funcional) dentro del dominio extracelular de GITR. En una forma de realización particular, el anticuerpo se fija específicamente al sitio en GITR al cual se fija GITR-L. En algunas formas de realización, el anticuerpo se fija específicamente a la región extracelular de GITR humano y a la región extracelular de GITR de *Macaca fascicularis*. Preferentemente, un anticuerpo se fija a GITR humano con alta afinidad.

XIII. Inmunoconjugados, derivados de anticuerpos y diagnóstico

Los anticuerpos que se describen en la presente se pueden usar para fines de diagnóstico, que incluyen las muestras de prueba y la formación de imágenes *in vivo*, y para este fin el anticuerpo (o el fragmento de fijación de este) se puede conjugar con un agente detectable adecuado para formar un inmunoconjugado. Para fines de diagnóstico, los agentes adecuados son etiquetas detectables que incluyen radioisótopos, para la formación de imágenes de cuerpo entero y radioisótopos, enzimas, etiquetas fluorescentes y otras etiquetas de anticuerpos adecuados para las muestras de prueba.

Las etiquetas detectables pueden ser cualquiera de los diversos tipos usados

actualmente en el campo del diagnóstico *in vitro*, que incluyen etiquetas de particulados, que incluyen soles metálicos, tales como oro coloidal, isotopos, tales como I^{125} o Tc^{99} presentados, por ejemplo, con un agente quelante peptídico del tipo N_2S_2 , N_3S o N_4 , cromóforos, que incluyen marcadores fluorescentes, luminescentes, fosforescentes y similares, así como etiquetas de enzimas que convierten un sustrato determinado en un marcador detectable, y etiquetas de polinucleótidos que se revelan luego de la amplificación, tal como mediante la reacción de cadena polimerasa. Las etiquetas de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y similares. Por ejemplo, la etiqueta puede ser la enzima fosfatasa alcalina, detectada mediante la medición de la presencia o formación de la quimioluminiscencia luego de la conversión de sustratos de 1,2 dioxetano, tales como adamantil metoxi fosforiloxi fenil dioxetano (AMPPD), 3-(4-(metoxispiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-cloro)tricyclo{3.3.1.1^{3,7}}decan}-4-il)fenilfosfato disódico (CSPD), así como CDP y CDP-star® u otros sustratos luminescentes conocidos por las personas del oficio de nivel medio, por ejemplo, los quelatos de lantánidos adecuados, tales como terbium(III) y europium(III). La detección significa que se determina mediante la etiqueta seleccionada. El aspecto de la etiqueta o sus productos de reacción se puede lograr a simple vista, en el caso en donde la etiqueta es un particulado y acumula en niveles adecuados, o usando instrumentos tales como un espectrofotómetro, luminómetro, fluorímetro y similares, todos de acuerdo con las prácticas estándares.

Preferentemente, los métodos de conjugación producen ligaduras que son sustancialmente (o casi) no inmunogénicas, por ejemplo, ligaduras de péptido (es decir, de amida), de sulfuro, (impedidas estéricamente), de disulfuro, de hidrazona y de éter. Estas ligaduras son casi no-inmunogénicas y muestran estabilidad razonable dentro de suero (véase, por ejemplo, Senter, P. D., Curr. Opin. Chem. Biol. 13 (2009) 235-244; WO 2009/059278; WO 95/17886).

Dependiendo de la naturaleza bioquímica de la porción y el anticuerpo, se pueden usar diferentes estrategias de conjugación. En caso de que la porción sea natural o recombinante de entre 50 a 500 aminoácidos, existen procesos estándares en bibliografía que describen la química para la síntesis de conjugados de proteínas, que pueden ser fácilmente implementados por la persona del oficio de nivel medio (véase, por ejemplo, Hackenberger, C. P. R. y Schwarzer, D., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 47 (2008) 10030-10074). En una forma de realización, se usa la reacción de una porción maleinimido con un residuo de cisteína dentro del anticuerpo o la porción. Esta es una química de acoplamiento especialmente adecuada en caso de que se use, por

ejemplo, un fragmento Fab o Fab' de un anticuerpo. De manera alternativa, en una forma de realización, se realiza el acoplamiento al extremo del terminal C del anticuerpo o la porción. La modificación del terminal C de una proteína, por ejemplo, de un fragmento Fab, se puede realizar, por ejemplo, como se describió (Sunbul, M. y Yin, J., *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 3361-3371).

En general, la reacción específica de sitio y el acoplamiento covalente se basa en la transformación de un aminoácido natural en un aminoácido con reactividad, que es ortogonal en la reactividad de otros grupos funcionales presentes. Por ejemplo, una cisteína específica dentro de un contexto de secuencia poco común se puede convertir enzimáticamente en un aldehído (véase, Frese, M. A. y Dierks, T., *ChemBioChem.* 10 (2009) 425-427). También es posible obtener la modificación del aminoácido deseado utilizando la reactividad enzimática específica de algunas enzimas con un aminoácido natural en un contexto de secuencias dado (véase, por ejemplo, Taki, M. et al., *Prot. Eng. Des. Sel.* 17 (2004) 119-126; Gautier, A. et al. *Chem. Biol.* 15 (2008) 128-136; y la formación catalizada con proteasa de enlaces C–N se usa en Bordusa, F., *Highlights in Bioorganic Chemistry* (2004) 389-403).

La reacción específica de sitio y el acoplamiento covalente también se pueden lograr mediante la reacción selectiva de aminoácidos del terminal con reactivos modificantes adecuados.

La reactividad de una cisteína del terminal N con benzonitrilos (véase, Ren, H. et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 9658-9662) se puede usar para lograr un acoplamiento covalente específico de sitio.

La ligadura química nativa también puede depender de los residuos de cisteína del terminal C (Taylor, E. Vogel; Imperiali, B, *Nucleic Acids and Molecular Biology* (2009), 22 (Protein Engineering), 65-96). EP 1 074 563 describe un método de conjugación que se basa en una reacción más rápida de una cisteína dentro de una porción de aminoácidos de carga negativa con una cisteína ubicada en una porción de aminoácidos de carga positiva.

La porción también puede ser un péptido sintético o una imitación de péptido. En caso de que un polipéptido se sintetice químicamente, los aminoácidos con reactividad química ortogonal se pueden incorporar durante la síntesis (véase por ejemplo, de Graaf, A. J. et al., *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 1281-1295). Debido a que una amplia variedad de grupos funcionales ortogonales está en juego y se puede introducir en un péptido sintético, la conjugación con tal péptido a un ligador es química estándar.

Para obtener un polipéptido monoetiquetado, el conjugado con estequiometría 1:1 se puede separar mediante cromatografía de otros subproductos de conjugación. Este procedimiento se ve facilitado mediante un miembro par fijado con etiqueta de tintura y un ligador cargado. El uso de este tipo de miembro par de fijación con alta carga negativa etiquetado, provoca que los polipéptidos monoconjugados se separen fácilmente de los polipéptidos no etiquetados y los polipéptidos que tienen más de un ligador, debido a que la diferencia en la carga y el peso molecular se pueden usar para la separación. La tintura fluorescente puede ser útil para purificar el complejo de los componentes no fijados, tal como un aglutinante monovalente etiquetado.

En una forma de realización, la porción unida a un anticuerpo anti-GITR se selecciona del grupo que consiste en una porción de fijación, una porción de etiquetado y una porción biológicamente activa.

Los anticuerpos descritos en la presente se pueden conjugar también con un agente terapéutico para formar un inmunoconjugado, tal como un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC). Los agentes terapéuticos adecuados incluyen antimetabolitos, agentes alquilantes, aglutinantes de surco menor de ADN, intercalantes de ADN, reticuladores de ADN, inhibidores de histona desacetilasa, inhibidores de la exportación nuclear, inhibidores del proteasoma, inhibidores de topoisomerasa I o II, inhibidores de la proteína de choque térmico, inhibidores de tirosina quinasa, antibióticos y agentes antimitóticos. En el ADC, el anticuerpo y el agente terapéutico se conjugan preferentemente mediante un ligador escindible, tal como un ligador de peptidilo, disulfuro o hidrazona. Con mayor preferencia, el ligador es un ligador de peptidilo, tal como Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO: 219), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser o Glu. Los ADC se pueden preparar como se describe en las patentes estadounidenses N.^{os} 7,087,600; 6,989,452 y 7,129,261; publicaciones PCT WO 02/096910, WO 07/038658, WO 07/051081, WO 07/059404, WO 08/083312 y WO 08/103693; las publicaciones de patentes estadounidenses 20060024317; 20060004081 y 20060247295; cuyas descripciones se incorporan en la presente por referencia.

Los anticuerpos anti-GITR, por ejemplo, los que se describen en la presente, también se pueden usar para detectar GITR, tal como GITR humano, por ejemplo, GITR humano en los tejidos o muestras de tejidos. Los anticuerpos se pueden usar, por ejemplo, en un ensayo ELISA o en citometría de flujo. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR se pone en contacto con células, por ejemplo,

células en un tejido, durante un período adecuado para que ocurra la fijación específica, y luego se agrega un reactivo, por ejemplo, un anticuerpo que detecta el anticuerpo anti-GITR. Los ensayos de ejemplo se proporcionan en los Ejemplos. El anticuerpo anti-GITR puede ser un anticuerpo completamente humano, o un anticuerpo quimérico, tal como un anticuerpo que tiene regiones variables humanas y regiones constantes murinas o una porción de estas. Los métodos ejemplificativos para detectar el GITR, por ejemplo, GITR humano, en una muestra (muestra celular o de tejido) comprenden (i) poner en contacto una muestra con un anticuerpo anti-GITR, durante un período suficiente para permitir la fijación específica del anticuerpo anti-GITR a GITR en la muestra, y (2) poner en contacto la muestra con un reactivo de detección, por ejemplo, un anticuerpo, que se fija específicamente al anticuerpo anti-GITR, tal como a la región Fc del anticuerpo anti-GITR, para detectar así el GITR fijado por el anticuerpo anti-GITR. Las etapas de lavado se pueden incluir luego de la incubación con el anticuerpo y/o el reactivo de detección. Los anticuerpos anti-GITR para el uso en estos métodos no tienen que estar ligados a una etiqueta ni a agentes de detección, se pueden usar como un agente de detección separado.

Otros usos de anticuerpos anti-GITR, por ejemplo, como monoterapia o terapia combinada, se proporcionan en otra parte de la presente, por ejemplo, en la sección que corresponde a los tratamientos combinados.

XIV. Moléculas biespecíficas

Los anticuerpos que se describen en la presente se pueden usar para formar moléculas biespecíficas. Un anticuerpo anti-GITR, o sus porciones de fijación al antígeno, se pueden derivar o ligar a otra molécula funcional, *por ejemplo*, otro péptido o proteína (*por ejemplo*, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se fija a al menos dos sitios de fijación diferentes o moléculas diana. Por ejemplo, un anticuerpo anti-GITR se puede ligar a un anticuerpo o scFv que se fija específicamente a cualquier proteína que se puede usar como diana potencial para tratamientos combinados, tales como las proteínas que se describen en la presente (por ejemplo, anticuerpos a PD-1, PD-L1 o LAG-3). El anticuerpo que se describe en la presente se puede derivatizar o unir a más de una molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se unan a más de dos sitios de fijación diferentes y/o moléculas diana; como se usa en la presente, la expresión “molécula biespecífica” también pretende abarcar dichas moléculas biespecíficas. Para crear una molécula biespecífica descrita en la presente, se puede unir funcionalmente un

anticuerpo descrito en la presente (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más moléculas de fijación, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de fijación, a fin de obtener una molécula biespecífica.

En consecuencia, en la presente se proporcionan moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de fijación para GTR y una segunda especificidad de fijación para un segundo epítipo diana. En una forma de realización que se describe en la presente, en donde la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede además incluir una tercera especificidad de fijación.

En una forma de realización, las moléculas biespecíficas que se describen en la presente comprenden como una especificidad de fijación al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo de este, que incluye, *por ejemplo*, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o Fv monocatenaria (scFv). El anticuerpo también puede ser un dímero de la cadena liviana o de la cadena pesada, cualquier fragmento mínimo de este, tal como Fv o un constructo monocatenario, como se describe en Ladner *et al.*, patente estadounidense N.º 4.946.778, cuyo contenido se incorpora en la presente por referencia.

Si bien se prefieren los anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos que se pueden emplear en las moléculas biespecíficas que se describen en la presente son anticuerpos monoclonales humanizados, murinos y quiméricos.

Las moléculas biespecíficas que se describen en la presente se pueden preparar conjugando las especificidades de fijación constitutivas usando los métodos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de fijación de la molécula biespecífica se puede generar por separado y luego conjugarse entre sí. Cuando las especificidades de fijación son proteínas o péptidos, se puede usar una variedad de acoplamiento o agentes de reticulación para la conjugación covalente. Los ejemplos de agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) y sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohaxan-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase, *por ejemplo*, Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. N.º 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81-83) y Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de fijación son anticuerpos, se pueden conjugar

mediante fijación de sulfhidrilo de las regiones bisagra del terminal C de las dos cadenas pesadas. En una forma de realización de particular preferencia, la región bisagra se modifica para contener un número impar de residuos de sulfhidrilo, preferentemente uno, antes de la conjugación.

De manera alternativa, ambas especificidades de fijación se pueden codificar en el mismo vector y expresar y ensamblar en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, mAb x (scFv)₂, Fab x F(ab')₂ o ligando x Fab. Un anticuerpo biespecífico puede comprender un anticuerpo que comprende un scFv en el terminal C de cada cadena pesada. Una molécula biespecífica que se describe en la presente puede ser una molécula monocatenaria que comprende un anticuerpo monocatenario y un determinante de fijación, o una molécula biespecífica monocatenaria que comprende dos determinantes de fijación. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas monocatenarias. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. N.º 5.260.203; patente de los EE. UU. N.º 5.455.030; patente de los EE. UU. N.º 4.881.175; patente de los EE. UU. N.º 5.132.405; patente de los EE. UU. N.º 5.091.513; patente de los EE. UU. N.º 5.476.786; patente de los EE. UU. N.º 5.013.653; patente de los EE. UU. N.º 5.258.498 y patente de los EE. UU. N.º 5.482.858.

La fijación de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas se puede confirmar usando los métodos reconocidos en el estado de la técnica, tales como ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, bioensayos (*por ejemplo*, inhibidor del crecimiento) o ensayo de transferencia Western. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos proteína-anticuerpo de interés particular al usar un reactivo etiquetado (*por ejemplo*, un anticuerpo) específico para el complejo de interés.

XV. Composiciones

Además, se proporcionan composiciones, *por ejemplo*, composiciones farmacéuticas que contienen una o una combinación de anticuerpos anti-GITR, o una combinación con anticuerpos con otras dianas, o porciones de fijación al antígeno de estos, que se describen en la presente, formuladas junto con un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Dichas composiciones pueden incluir un anticuerpo o una combinación de anticuerpos (*por ejemplo*, dos o más anticuerpos

diferentes) o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas que se describen en la presente. Por ejemplo, una composición farmacéutica descrita en la presente puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o biespecíficos) que se fijan a diferentes epítopos en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias.

En algunas formas de realización, una composición que comprende un anticuerpo anti-GITR a una concentración de al menos 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 1-300 mg/ml o 100-300 mg/ml.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente también se pueden administrar en una terapia combinada, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia combinada puede incluir un anticuerpo anti-GITR descrito en la presente combinado con al menos otro agente antineoplásico y/o agente estimulante de linfocitos T (por ejemplo, de activación). Los ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden usar en la terapia combinada se describen en mayor detalle más adelante en la sección de usos de los anticuerpos descritos en la presente.

En algunas formas de realización, las composiciones terapéuticas descritas en la presente pueden incluir otros compuestos, fármacos y/o agentes usados para el tratamiento del cáncer. Estos compuestos, fármacos y/o agentes pueden incluir, por ejemplo, fármacos de quimioterapia, fármacos de moléculas pequeñas o anticuerpos que estimulan la respuesta inmunitaria a una clase de cáncer determinada. En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir, por ejemplo, uno o más anticuerpos anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti-PDL-1, anti-OX40 (también denominados CD134, TNFRSF4, ACT35 y/o TXGP1L), anti-CD137 o anti-LAG-3.

Como se usa en la presente, un "portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico" incluye todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes demoradores de la absorción e isotónicos similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Según la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, el inmunoconjugado o la molécula biespecífica, se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos descritos en la presente pueden incluir una o más sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico. Una "sal aceptable desde

el punto de vista farmacéutico" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto de origen y no produce ningún efecto toxicológico no deseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Los ejemplos de estas sales incluyen sales de adición ácida y sales de adición básica. Las sales de adición ácida incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosfórico y similares, y también de ácidos orgánicos no tóxicos, tales como ácidos monocarboxílicos y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos aromáticos y alifáticos, y similares. Las sales de adición básica incluyen aquellas que derivan de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición farmacéutica descrita en la presente también puede incluir un antioxidante aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Los ejemplos de antioxidantes aceptables desde el punto de vista farmacéutico incluyen: (1) antioxidantes hidrosolubles, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamintetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas descritas en la presente incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de estos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La correcta fluidez se puede mantener, por ejemplo, usando materiales de recubrimiento, tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y usando tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, emulgentes y dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede garantizar mediante procedimientos de esterilización, *supra*, y mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsórbico y similares.

También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que demoran la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en el estado de la técnica. Excepto en el caso de que un medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas descritas en la presente. Una composición farmacéutica puede comprender un conservante o puede no tenerlo. Se pueden incorporar los compuestos activos complementarios en las composiciones.

Con frecuencia, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para obtener una concentración farmacológica alta. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de estos. La correcta fluidez se puede mantener, por ejemplo, usando un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y usando tensioactivos. En muchos casos, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede obtener incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad necesaria en un solvente adecuado con uno de los ingredientes mencionados anteriormente o una combinación de estos, según sea necesario, seguido de la microfiltración para su esterilización. En general, las dispersiones se prepararon mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básica y los otros ingredientes requeridos que se enumeraron en la presente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo, más

cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración de aquel.

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una única forma de dosificación variará según el sujeto que se trate y el modo de administración particular. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una única forma de dosificación será, generalmente, la cantidad de composición que produzca un efecto terapéutico. En general, del 100 %, esta cantidad variará de alrededor del 0,01 % a alrededor del 99 % de ingrediente activo, preferentemente, de alrededor de 0,1 % a alrededor del 70 %, con máxima preferencia, de alrededor del 1 % a alrededor del 30 % del ingrediente activo, en combinación con un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

Los regímenes de dosificación se ajustan para brindar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas con el tiempo, o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente, según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. En especial, resulta ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. Como se usa en la presente, la forma de dosis unitaria se refiere a unidades físicamente diferenciadas útiles como dosis unitarias para los sujetos que se tratan; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el portador farmacéutico requerido. La especificación de las formas de dosis unitaria descritas en la presente depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se desea obtener, y (b) las limitaciones inherentes en el arte de obtener dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en seres humanos.

Para la administración del anticuerpo, las dosis varían de alrededor de 0,0001 a 100 mg/kg y, con mayor frecuencia, de 0,01 a 5 o 10 mg/kg del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del rango de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento de ejemplo implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez por mes, una vez cada tres meses o una vez cada tres a seis meses. Los regímenes preferidos de

administración de la dosis para un anticuerpo anti-GITR descritos en la presente incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal para la administración intravenosa; para el anticuerpo que se administra se usa uno de los siguientes regímenes de dosis: (i) cada cuatro semanas para seis dosificaciones, luego cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez y luego 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

Un anticuerpo anti-GITR se puede administrar a una dosis fija (régimen de dosis fija).

En algunos métodos, se administran de manera simultánea dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado se encuentra dentro de los rangos indicados. Por lo general, el anticuerpo se administra en numerosas ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas pueden ser, por ejemplo, semanales, mensuales, trimestrales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares según se indique al medir los niveles de anticuerpos en sangre para el antígeno diana en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para alcanzar una concentración plasmática del anticuerpo de alrededor de 1-1000 µg/ml y, en algunos métodos, alrededor de 25-300 µg /ml.

Un anticuerpo anti-GITR se puede administrar con otro anticuerpo en el régimen de dosificación del otro anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo anti-GITR se puede administrar con un anticuerpo anti-PD-1, tal como nivolumab (OPDIVO), cada dos semanas como una infusión i.v. durante 60 minutos hasta que ocurra el avance de la enfermedad o la toxicidad sea inaceptable. Un anticuerpo anti-GITR se puede administrar con pembrolizumab (KEYTRUDA), cada tres semanas como una infusión i.v. durante 30 minutos hasta que ocurra el avance de la enfermedad o la toxicidad sea inaceptable.

Un anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían según la semivida del anticuerpo en el paciente. Por lo general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más prolongada, seguido por anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar en función de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En el caso de aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un período prolongado. Algunos pacientes reciben el tratamiento de por vida. En el caso de aplicaciones terapéuticas, en ocasiones, es necesaria una dosis relativamente alta a

intervalos relativamente cortos hasta que se reduzca o se concluya la progresión de la enfermedad, y preferentemente, hasta que el paciente muestre una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de ahí, el paciente puede recibir un régimen profiláctico.

Los niveles de dosis reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas que se describen en la presente pueden variar, a fin de obtener una cantidad de ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración particulares sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de varios factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares que se usan en la presente descripción, o del éster, la sal o la amida de aquel, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se use, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares que se usen, la edad, el sexo, el peso, la afección, la salud en general y los antecedentes médicos del paciente que está en tratamiento y factores similares conocidos en la técnica médica.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-GITR como se describe en la presente da como resultado, preferentemente, una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia y duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad, o la prevención de disfunciones o incapacidades causadas por la enfermedad. En el contexto del cáncer, una dosis eficaz desde el punto de vista terapéutico da como resultado, preferentemente, una mayor supervivencia y/o prevención del deterioro adicional de los síntomas físicos relacionados con el cáncer. Los síntomas del cáncer son conocidos en el estado de la técnica e incluyen, por ejemplo, características de moles inusuales, cambio en el aspecto del mol, que incluye asimetría, borde, color y/o diámetro, área de piel recientemente pigmentada, mol anormal, área oscurecida debajo de la uña, bultos en el pecho, cambios en pezones, quistes mamarios, dolor de pecho, muerte, pérdida de peso, debilidad, fatiga excesiva, dificultad alimentaria, pérdida del apetito, tos crónica, dificultad respiratoria en deterioro, expectoración de sangre, sangre en la orina, sangre en las heces, náuseas, vómitos, metástasis hepática, metástasis pulmonar, metástasis ósea, inflamación abdominal, hinchazón, líquido en la cavidad peritoneal, hemorragia vaginal, constipación, distensión abdominal, perforación del colon, peritonitis aguda (infección, fiebre, dolor), dolor, vómitos de sangre, transpiración intensa, fiebre, presión

sanguínea alta, anemia, diarrea, ictericia, mareos, escalofríos, espasmos musculares, metástasis de colon, metástasis pulmonar, metástasis de vejiga, metástasis hepática, metástasis ósea, metástasis de riñón y metástasis pancreática, dificultad para tragar, y similares.

Una dosis eficaz desde el punto de vista terapéutico puede evitar o retrasar la aparición del cáncer, tal como puede ser deseable ante los signos tempranos o preliminares de la enfermedad. Las pruebas de laboratorio utilizadas en el diagnóstico del cáncer incluyen las químicas (que incluye la medición de los niveles de GTR), la hematología, serología y radiología. En consecuencia, cualquier ensayo clínico o bioquímico que monitorea lo mencionado anteriormente se puede usar para determinar si un tratamiento particular es una dosis eficaz desde el punto de vista terapéutico para tratar el cáncer. Una persona del oficio de nivel medio sería capaz de determinar esas cantidades en función de ciertos factores, tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición o vía de administración particulares seleccionadas.

Una composición como se describe en la presente se puede administrar a través de una o más vías de administración usando uno o más métodos conocidos en el estado de la técnica. La persona del oficio de nivel medio considerará que la vía de administración y/o el modo de administración variarán en función de los resultados deseados. Las vías de administración preferidas de los anticuerpos que se describen en la presente incluyen las siguientes: intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenterales, por ejemplo, inyección o infusión. La expresión “administración parenteral”, como se usa en la presente, significa modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, por lo general, mediante inyección, e incluye, entre otras, la infusión y la inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal.

De manera alternativa, un anticuerpo descrito en la presente se puede administrar a través de una vía no parenteral, tal como la vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los compuestos activos se pueden preparar con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración

microencapsulada. Se pueden usar polímeros biodegradables biocompatibles, tales como etileno vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, polioctoésteres y ácido poliláctico. Muchos de los métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o, en general, son conocidos por las personas del oficio de nivel medio. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, en una forma de realización preferida, una composición terapéutica descrita en la presente se puede administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en las patentes estadounidenses N.^{os} 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824 o 4.596.556. Los ejemplos de los implantes conocidos y los módulos para usar con los anticuerpos anti-GITR que se describen en la presente incluyen: la patente estadounidense N.º 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para administrar medicamentos a una velocidad controlada; la patente estadounidense N.º 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente estadounidense N.º 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicamentos para administrar medicamentos a una velocidad de infusión precisa; la patente estadounidense N.º 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; la patente estadounidense N.º 4.439.196, que describe un sistema de administración de fármacos osmóticos, que tiene compartimientos multicámara; y la patente estadounidense N.º 4.475.196, que describe un sistema de administración de fármacos osmóticos. Estas patentes se incorporan en la presente por referencia. Existen numerosos implantes, sistemas de administración y módulos conocidos por las personas del oficio de nivel medio.

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR descritos en la presente se pueden formular para asegurar la distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye numerosos compuestos altamente hidrófilos. A fin de garantizar que los compuestos terapéuticos descritos en la presente atraviesen la BBB (si se desea, por ejemplo, para cáncer de cerebro), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.^{os} 4,522,811, 5,374,548 y 5,399,331. Los liposomas pueden comprender una o más porciones que se transportan selectivamente a células u órganos específicos y, por lo tanto, mejoran la

administración farmacológica dirigida (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Los ejemplos de porciones de direccionamiento incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 5,416,016 de Low et al.); manósidos (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptor de la proteína A del tensioactivo (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); véase también K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

XVI. Usos y métodos

Los anticuerpos, las composiciones de anticuerpo y los métodos que se describen en la presente tienen numerosas utilidades *in vitro* e *in vivo* que incluyen, por ejemplo, la mejora de la respuesta inmunitaria mediante la activación de la señalización GITR, o la detección de GITR. En una forma de realización preferida, los anticuerpos descritos en la presente son anticuerpos humanos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-GITR descritos en la presente se pueden administrar a las células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para mejorar la inmunidad en una variedad de enfermedades. En consecuencia, en la presente se proporcionan métodos para modificar una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, que se describe en la presente de manera que se modifique la respuesta inmunitaria en el sujeto. Preferentemente, la respuesta es mejorada, estimulada o regulada en forma ascendente.

Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos en los que la mejora de una respuesta inmunitaria es deseable. Los métodos son particularmente adecuados para tratar pacientes humanos que presentan un trastorno que se puede tratar aumentando una respuesta inmunitaria (por ejemplo, la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T, tal como una respuesta de linfocitos T específicos del antígeno). En una forma de realización particular, los métodos son particularmente adecuados para el tratamiento del cáncer *in vivo*. Para obtener una mejora de la inmunidad específica del antígeno, los anticuerpos anti-GITR que se describen en la presente se pueden administrar junto con un antígeno de interés, o el antígeno puede ya estar presente en el sujeto que se tratará (por ejemplo, un sujeto que tiene un tumor o un virus). Cuando los anticuerpos de GITR se administran junto con otro agente, ambos pueden administrarse de

manera separada o simultánea.

También, se incluyen métodos para detectar la presencia del antígeno GTR humano en una muestra o medir la cantidad de antígeno GTR humano; estos métodos comprenden poner en contacto la muestra y una muestra de control con un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humano o una porción de este de fijación al antígeno, que se fija específicamente a GTR humano, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o una porción de este y GTR humano. Luego se detecta la formación de un complejo, en donde la formación de un complejo diferente entre la muestra en comparación con la muestra de control indica la presencia del antígeno GTR humano en la muestra. Además, los anticuerpos anti-GTR que se describen en la presente se pueden usar para purificar el GTR humano mediante la purificación por inmunoafinidad.

Dada la capacidad de los anticuerpos anti-GTR que se describen en la presente para estimular o coestimular las respuestas de linfocitos T, por ejemplo, respuestas de linfocitos T específicos del antígeno, en la presente se proporcionan métodos *in vitro* e *in vivo* de uso de anticuerpos que se describen en la presente para estimular, mejorar o regular de manera ascendente las respuestas de linfocitos T específicos del antígeno, por ejemplo, respuestas de linfocitos T antitumorales. En algunas formas de realización, la estimulación de CD3 también se proporciona (por ejemplo, mediante coincubación con una célula que expresa la membrana CD3), cuya estimulación se puede proporcionar al mismo tiempo, antes o después de la estimulación con un anticuerpo anti-GTR. Por ejemplo, se proporcionan en la presente métodos para estimular una respuesta de linfocitos T específicos del antígeno que comprenden poner en contacto el linfocito T con un anticuerpo anti-GTR descrito en la presente, y opcionalmente, con un anticuerpo anti-CD3, de modo que se estimula una respuesta de linfocitos T específicos del antígeno. Se puede usar cualquier indicador adecuado de una respuesta de los linfocitos T específicos del antígeno para medir la respuesta de los linfocitos T específicos del antígeno. Los ejemplos no limitantes de estos indicadores adecuados incluyen el aumento de la proliferación de linfocitos T en presencia del anticuerpo y/o el aumento de la producción de citocina en presencia del anticuerpo. En una forma de realización preferida, se estimula la producción de interleucina 2/o interferon- γ por parte del linfocito T específico del antígeno.

Los linfocitos T que se pueden mejorar o coestimular con anticuerpos anti-GTR incluyen linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺. Los linfocitos T pueden ser linfocitos T_{eff}, por ejemplo, linfocitos T_{eff} CD4⁺, linfocitos T_{eff} CD8⁺, linfocitos T

colaboradores (T_h) y linfocitos T citotóxicos (T_c).

Asimismo, se incluyen métodos para estimular una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta de los linfocitos T específicos del antígeno) en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-GITR que se describe en la presente, de manera que se estimule una respuesta inmunitaria (por ejemplo, la respuesta de los linfocitos T específicos del antígeno) en el sujeto. En una forma de realización preferida, el sujeto tiene un tumor, y se estimula una respuesta inmunitaria contra el tumor. El tumor puede ser un tumor sólido o puede ser un tumor líquido, tal como un cáncer hematológico. En algunas formas de realización, un tumor es un tumor inmunogénico. En algunas formas de realización, un tumor es un tumor no inmunogénico. En algunas formas de realización, un tumor es PD-L1 positivo. En algunas formas de realización un tumor es PD-L1 negativo. El sujeto también puede ser un sujeto que tiene un virus, y una respuesta inmunitaria contra el virus se estimula.

También se proporcionan métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto un anticuerpo anti-GITR descrito en la presente, de manera que se inhiba el crecimiento del tumor en el sujeto. También se proporcionan métodos para tratar una infección viral en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto un anticuerpo anti-GITR descrito en la presente, de manera que se trate la infección viral en el sujeto.

También se incluyen en la presente métodos para reducir linfocitos T_{reg} del microentorno tumoral de un sujeto que tiene, por ejemplo, tumores cancerígenos, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico del anticuerpo anti-GITR descrito en la presente que comprenden un Fc que estimula la reducción de linfocitos T_{reg} en el microentorno tumoral. Un Fc puede, por ejemplo, ser un Fc con función efectora o función efectora mejorada, tal como fijación o que tiene fijación mejorada a uno o más receptores Fc activadores. En una forma de realización preferida, la reducción de T_{reg} ocurre sin reducción significativa ni inhibición de T_{eff} en el microentorno tumoral y sin reducción significativa ni inhibición de linfocitos T_{eff} y linfocitos T_{reg} fuera del microentorno tumoral, por ejemplo, en la periferia. En algunas formas de realización, el sujeto tiene mayores niveles de GITR en los linfocitos T_{reg} que en los linfocitos T_{eff} , por ejemplo, en el microentorno tumoral.

En algunas formas de realización, un sujeto se trata con un anticuerpo anti-GITR que tiene un Fc que mejora el agonismo, por ejemplo, se fija o tiene fijación mejorada al FcRIIb inhibitorio. Algunos tratamientos se realizan con un anticuerpo anti-

GITR que tiene un Fc que no se fija, o tiene fijación reducida a uno o más FcR activadores. Los anticuerpos anti-GITR pueden reducir Treg en tumores y/o Treg en linfocitos infiltrantes de tumor (TIL).

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR se proporciona a un sujeto como terapia complementaria. Los tratamientos en sujetos que padecen cáncer con un anticuerpo anti-GITR pueden generar supervivencia prolongada, por ejemplo, respuesta duradera a largo plazo en relación con el cuidado estándar actual; supervivencia a largo plazo de al menos 3 meses, 6 meses, 9 meses, 1, 2, 3, 4, 5, 10 o más años, o supervivencia libre de enfermedad de al menos 3 meses, 6 meses, 9 meses, 1, 2, 3, 4, 5 o 10 o más años. En algunas formas de realización, el tratamiento de un sujeto que padece cáncer con un anticuerpo anti-GITR previene la recurrencia del cáncer o la demora en un período de, por ejemplo, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 1, 2, 3, 4, 5 o 10 o más años. Un tratamiento con anti-GITR se puede usar como un tratamiento de primera, segunda o tercera línea.

En formas de realización preferidas, un anticuerpo anti-GITR descrito en la presente no es significativamente tóxico. Por ejemplo, un anticuerpo GITR no es significativamente tóxico para un órgano de un ser humano, por ejemplo, uno o más de hígado, riñón, cerebro, pulmones y corazón, como se determinó, por ejemplo, en ensayos clínicos. En algunas formas de realización, un anticuerpo GITR no activa significativamente una respuesta inmunitaria no deseada, por ejemplo, autoinmunidad o inflamación.

En algunas formas de realización, el tratamiento de un sujeto con un agonista anti-GITR (por ejemplo, un anticuerpo anti-GITR) no provoca la sobrestimulación del sistema inmunitario en la medida que el sistema inmunitario del sujeto luego ataca al sujeto en sí mismo (por ejemplo, respuesta autoinmunitaria) o provoca, por ejemplo, anafilaxis. Así, los anticuerpos anti-GITR, preferentemente, no causan anafilaxis.

En algunas formas de realización, el tratamiento de un sujeto con un anticuerpo anti-GITR descrito en la presente, por ejemplo, un anticuerpo que comprende las CDR o las regiones variables de 28F3, no ocasionan reacciones inflamatorias significativas, por ejemplo, neumonía inmunitaria, colitis inmunitaria, hepatitis inmunitaria, nefritis inmunitaria o disfunción renal, hipofisitis inmunitaria, hipotiroidismo inmunitario e hipotiroidismo, u otras reacciones inmunitarias adversas. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR que comprende las CDR o las regiones variables de 28F3 ocasiona menos reacciones inflamatorias que otros anticuerpos anti-GITR, por ejemplo, neumonía inmunitaria, colitis inmunitaria, hepatitis inmunitaria, nefritis

inmunitaria o disfunción renal, hipofisitis inmunitaria, hipotiroidismo inmunitario e hipotiroidismo, anafilaxis u otras reacciones inmunitarias adversas. Otras reacciones adversas inmunitarias incluyen trastornos cardíacos, por ejemplo, arritmia ventricular; trastornos oculares, por ejemplo, iridociclitis; reacciones relacionadas con la infusión; mayor amilasa, mayor lipasa; trastornos del sistema nervioso, por ejemplo, mareos, neuropatía periférica y sensorial; trastornos del tejido dérmico y subcutáneo, por ejemplo, erupción cutánea, prurito, dermatitis exfoliativa, eritema multiforme, vitiligo o psoriasis; trastornos respiratorios, torácicos y mediastínicos, por ejemplo, tos; fatiga; náuseas; disminución de apetito; constipación; artralgia y diarrea.

En algunas formas de realización, un anticuerpo GITR proporciona efectos antitumorales sinérgicos en combinación con otra terapia contra el cáncer, tal como un compuesto que estimula el sistema inmunitario (por ejemplo, un agente inmunooncológico), por ejemplo, un compuesto descrito en la presente o un compuesto que modula una diana descrita en la presente.

Estos y otros métodos que se describen en la presente se analizan a continuación en más detalle.

Cáncer

La activación de GITR mediante los anticuerpos anti-GITR puede mejorar la respuesta inmunitaria a las células cancerígenas en el paciente. En la presente se proporcionan métodos para tratar a un sujeto que padece cáncer, que comprenden administrar al sujeto un anticuerpo anti-GITR descrito en la presente, de modo que el sujeto se trata, por ejemplo, de modo tal que se inhibe o se reduce el crecimiento de tumores cancerígenos y/o se produce la regresión tumoral y/o se logra una supervivencia prolongada. Se puede usar un anticuerpo anti-GITR solo para inhibir el crecimiento de tumores cancerígenos. De manera alternativa, se puede usar un anticuerpo anti-GITR junto con otros agentes, por ejemplo, otros agentes inmunogénicos, tratamientos oncológicos estándares, u otro anticuerpo, como se describe a continuación.

En consecuencia, en la presente se proporcionan métodos para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-GITR descrito en la presente, por ejemplo, 28F3.IgG1 o 28F3.IgG1.1, o una porción de estos de fijación al antígeno. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-GITR humano (por ejemplo, cualquier anticuerpo GITR humano antihumano

descrito en la presente). De manera adicional o alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-GITR quimérico o humanizado, por ejemplo, un anticuerpo anti-GITR quimérico o humanizado que comprende secuencias de 28F3 u otros anticuerpos anti-GITR descritos en la presente.

Los tipos de cáncer cuyo crecimiento se puede inhibir mediante los anticuerpos de la invención incluyen los tipos de cáncer que generalmente responden a la inmunoterapia y aquellos que no. Los tipos de cáncer pueden ser aquellos con tumores sólidos o neoplasias hemotógicas (tumores líquidos). Los ejemplos no limitativos de tipos de cáncer para tratamiento incluyen carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas escamosas (NSCLC), NSCLC de células no escamosas, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma de células claras), cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma de células renales (RCC)), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata resistente al tratamiento hormonal), cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma (glioblastoma multiforme), cáncer de cuello de útero, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer (o carcinoma) de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumores de células germinales, sarcoma pediátrico, *natural killer* sinonasal, melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico, tal como melanoma maligno cutáneo o intraocular), cáncer óseo, cáncer de piel, cáncer de útero, cáncer de la región anal, cáncer testicular, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello de útero, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endócrino, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma del tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, tumores sólidos de la infancia, cáncer de uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasma del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, cáncer cerebral, glioma del tronco encefálico, adenoma pituitario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de linfocitos T, tipos de cáncer provocados por el entorno, que incluyen los provocados por el amianto, tipos de cáncer relacionados con virus o tipos de cáncer de origen viral (por ejemplo, virus del papiloma humano (tumores relacionados con el HPV o que se originan del HPV)) y tipos de cáncer hematológicos derivados de los dos principales linajes de glóbulos rojos, es decir, la línea celular

mieloide (que produce granulocitos, eritrocitos, trombocitos, macrófagos y mastocitos) o línea celular linfoide (que produce linfocitos B, T, células NK y células plasmáticas), tales como todos los tipos de leucemias, linfomas y mielomas, por ejemplo, leucemias linfocíticas y/o mieloides agudas, crónicas, tales como leucemia aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL) y leucemia mieloide crónica (CML), AML indiferenciada (M0), leucemia mieloblástica (M1), leucemia mieloblástica (M2; con maduración celular), leucemia promielocítica (M3 o variante de M3 [M3V]), leucemia mielomonocítica (M4 o variante de M4 con eosinofilia [M4E]), leucemia monocítica (M5), eritroleucemia (M6), leucemia megacarioblástica (M7), sarcoma granulocítico aislado y cloroma; linfomas, tales como linfoma de Hodgkin (HL), linfoma de no Hodgkin (NHL), cáncer hematológico de linfocitos B, por ejemplo, linfomas de linfocitos B, linfomas de linfocitos T, linfoma linfoplasmacitoide, linfoma monocitoide de linfocitos B, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), linfoma anaplásico (por ejemplo, Ki 1+) de células grandes, linfoma/leucemia de linfocitos T en adultos, linfoma de células del manto, linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T, linfoma angiocéntrico, linfoma intestinal de linfocitos T, linfoma mediastínico primario de linfocitos B, linfoma linfoblástico de precursores T y leucemia/linfoma linfoblástico T (T-ALL/T-Lbly), linfoma periférico de linfocitos T, linfoma linfoblástico, trastorno linfoproliferativo después del trasplante, linfoma histiocítico verdadero, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma de efusión primaria, linfoma de linfocitos B, linfoma linfoblástico (LBL), tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, leucemia linfoblástica aguda, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, linfoma histiocítico difuso (DHL), linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico de precursores B, linfoma cutáneo de linfocitos T (CTLC) (también denominado micosis fungoide o síndrome de Sezary) y linfoma linfoplasmacitoide (LPL) con macroglobulinemia de Waldenstrom; mielomas, tales como mieloma de IgG, mieloma de la cadena liviana, mieloma no secretor, mieloma quiescente (también denominado mieloma de escasa malignidad), plasmocitoma solitario y mielomas múltiples, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma de tricoleucocitos; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, tumores de origen mesenquimatoso, que incluyen fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; seminoma, teratocarcinoma, tumores del sistema nervioso central y periférico, que incluyen astrocitoma, schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, que incluyen fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, que incluyen melanoma, xerodermia pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroide y teratocarcinoma, tumores

hematopoyéticos de linaje linfoide, por ejemplo, tumores de linfocitos T y B, que incluye, entre otros, trastornos de linfocitos T, tales como leucemia prolinfocítica T (T-PLL), que incluye la célula pequeña y el tipo celular cerebriforme; leucemia de linfocitos grandes granulares (LGL), preferentemente, del tipo linfocito T; linfoma hepatoesplénico a/d T-NHL ; linfoma de linfocitos T periféricos/post-timo (subtipos pleomórficos e inmunoblásticos); linfoma de linfocitos T angiocéntricos (nasal); cáncer de cabeza o cuello, cáncer renal, cáncer rectal, cáncer de la glándula tiroidea; linfoma mieloide agudo , así como cualquier combinación de estos tipos de cáncer. Los métodos descritos en la presente también se pueden usar para el tratamiento de los tipos de cáncer metastásicos, no extirpables y/o refractarios (por ejemplo, tipos de cáncer refractarios a la inmunoterapia previa, por ejemplo, con un anticuerpo CTLA-4 o PD-1 bloqueante), y tipos de cáncer recurrentes.

En algunas formas de realización, un Ab anti-GITR se administra a pacientes que padecen de cáncer que inhibieron una respuesta inadecuada a un tratamiento anterior, por ejemplo, un tratamiento anterior con un fármaco inmunooncológico, o pacientes que padecen de cáncer que es refractario o resistente, ya sea refractario o resistente intrínsecamente (por ejemplo, refractario al antagonista de la vía de PD-1), o en donde se adquiere el estado refractario o de resistencia. Por ejemplo, los sujetos que no responden o que no lo hacen en forma suficiente a una primera terapia, o en los que se evidencia el avance de la enfermedad luego del tratamiento, por ejemplo, el tratamiento con anti-PD-1, pueden ser tratados con la administración de un anticuerpo anti-GITR solo o combinado con otra terapia (por ejemplo, con una terapia anti-PD-1).

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR se administra a pacientes que no recibieron anteriormente (es decir, no tratados previamente) un agente inmunooncológico, por ejemplo, un antagonista de la vía de PD-1.

Un anticuerpo anti-GITR se puede administrar con un tratamiento de cuidado estándar. Un anticuerpo anti-GITR se puede administrar como terapia de mantenimiento, por ejemplo, una terapia que pretende evitar la aparición o recurrencia de tumores.

Un anticuerpo anti-GITR se puede administrar con otro tratamiento, por ejemplo, radiación, cirugía o quimioterapia. Por ejemplo, una terapia complementaria con anticuerpos anti-GITR se puede administrar cuando existe riesgo de la existencia de micrometástasis y/o a fin de reducir el riesgo de una recaída.

Un anticuerpo anti-GITR se puede administrar como monoterapia, o como la única terapia inmunoestimulante. Los anticuerpos a GITR, por ejemplo, los anticuerpos

anti-GITR descritos en la presente, se pueden combinar con un agente inmunogénico, tal como células cancerígenas, antígenos tumorales purificados (que incluyen proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidratos), células y células transfectadas con genes que codifican citocinas estimulantes del sistema inmunitario (He et al (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Los ejemplos de vacunas antitumorales que se pueden usar incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citocina GM-CSF (analizada más adelante).

En los seres humanos, algunos tumores demostraron ser inmunogénicos, tales como los melanomas. Al reducir el umbral de activación de linfocitos T mediante activación de GITR, se pueden activar las respuestas tumorales, lo que permite el tratamiento de tumores no inmunogénicos o aquellos que tienen inmunogenicidad limitada.

Un anticuerpo anti-GITR, por ejemplo, un anticuerpo anti-GITR que se describe en la presente, se puede combinar con un protocolo de vacunación. Se trazaron diversas estrategias experimentales para la vacunación contra los tumores (véanse Rosenberg, S., 2000, *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 300-302; Khayat, D. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 414-428; Foon, K. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 730-738; véase también Restifo, N. y Sznol, M., *Cancer Vaccines*, capítulo 61, pp. 3023-3043 en DeVita et al. (eds.), 1997, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, quinta edición). En una de estas estrategias, se prepara una vacuna en la que se usan células tumorales autólogas o alogénicas. Estas vacunas celulares demostraron ser más eficaces cuando las células tumorales se transducen para expresar GM-CSF. GM-CSF demostró ser un activador potente de la presentación de antígenos para la vacunación contra los tumores (Dranoff et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 90: 3539-43).

El estudio de los patrones de expresión génica y de expresión génica a gran escala en diversos tumores produjo la definición de los denominados antígenos específicos de tumores (Rosenberg, S A (1999) *Immunity* 10: 281-7). En varios casos, estos antígenos específicos de tumores son antígenos de diferenciación que se expresan en los tumores y en la célula donde se produjo el tumor, por ejemplo, antígenos melanocitos gp100, antígenos MAGE y Trp-2. Lo que es más importante, se puede demostrar que muchos de estos antígenos son las dianas de linfocitos T específicos del tumor en el huésped. La activación de GITR se puede usar en

combinación con un conjunto de proteínas recombinantes y/o péptidos expresados en un tumor, a fin de generar una respuesta inmunitaria a estas proteínas. En general, el sistema inmunitario considera estas proteínas como autoantígenos y, por lo tanto, son tolerantes a ellos. El antígeno tumoral puede incluir la proteína telomerasa, que es necesaria para la síntesis de telómeros de cromosomas y que se expresa en más del 85 % de los tipos de cáncer en seres humanos y solo en una cantidad limitada de tejidos somáticos (Kim et al. (1994) *Science* 266: 2011-2013). El antígeno tumoral también puede ser un "neoantígeno" expresado en células cancerígenas debido a las mutaciones somáticas que alteran la secuencia proteica o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no relacionadas (es decir, bcr-abl en el cromosoma Philadelphia), o idioma de tumores de linfocitos B.

Otras vacunas antitumorales pueden incluir las proteínas de virus implicados en ciertos tipos de cáncer humano, tales como el virus del papiloma humano (HPV), el virus de la hepatitis (HBV y HCV) y el virus herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KHSV). Otra forma de antígeno específico de tumores que se puede usar junto con la activación de GITR son las proteínas de choque térmico (HSP) purificadas aisladas del tejido tumoral en sí mismo. Estas proteínas de choque térmico contienen fragmentos de proteínas de las células tumorales, y estas HSP son altamente eficaces para el suministro a las células que presentan antígenos, a fin de provocar inmunidad tumoral (Suot & Srivastava (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura et al. (1997) *Science* 278:117-120).

Las células dendríticas (DC) son antígenos potentes que presentan células que se pueden usar para cebar respuestas específicas del antígeno. Las DC se pueden producir *ex vivo* y cargar con varios antígenos de proteínas y péptidos, así como extractos de células tumorales (Nestle et al. (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). Asimismo, las DC también se pueden transducir por medios genéticos para que también expresen estos antígenos tumorales. Las DC también se fusionaron directamente a las células tumorales, a fin de lograr la inmunización (Kugler et al. (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). Como método de vacunación, la inmunización de DC se puede combinar de manera eficaz con la activación de GITR para activar respuestas antitumorales más potentes.

La activación de GITR también se puede combinar con tratamientos contra el cáncer estándar (por ejemplo, cirugía, radiación y quimioterapia). La activación de GITR se puede combinar de manera eficaz con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, es posible reducir la dosis de reactivos quimioterapéuticos administrados

(Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Un ejemplo de tal combinación es un anticuerpo anti-GITR en combinación con decarbazina para el tratamiento del melanoma. Otro ejemplo de tal combinación es un anticuerpo anti-GITR en combinación con interleucina-2 (IL-2) para el tratamiento del melanoma. La razón científica del uso combinado de la activación de GITR y la quimioterapia es que la muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos, debería provocar el aumento de los niveles de antígenos tumorales en la vía de presentación de antígenos. Otras terapias combinadas que pueden dar como resultado la sinergia con la activación de GITR mediante la muerte celular son la radiación, la cirugía y la carencia hormonal. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el huésped. Los inhibidores de la angiogénesis también se pueden combinar con la activación de GITR. La inhibición de la angiogénesis produce la muerte de células tumorales que podrían alimentar el antígeno tumoral en las vías de presentación del antígeno huésped.

Los anticuerpos anti-GITR descritos en la presente también se pueden usar en combinación con anticuerpos biespecíficos que dirigen las células efectoras que expresan el receptor $Fc\alpha$ o $Fc\gamma$ a las células tumorales (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.^{os} 5.922.845 y 5.837.243). Los anticuerpos biespecíficos se pueden usar para dirigir dos antígenos separados. Por ejemplo, se usaron anticuerpos biespecíficos del receptor anti-Fc/antígeno antitumoral (por ejemplo, Her-2/neu) para dirigir macrófagos hacia los sitios tumorales. Este direccionamiento puede activar de manera más eficaz las repuestas específicas tumorales. El brazo de los linfocitos T de estas respuestas se podría aumentar mediante la activación de GITR. De manera alternativa, el antígeno se puede administrar directamente a las DC usando anticuerpos biespecíficos que se fijan al antígeno tumoral y un marcador de superficie celular específico de célula dendrítica.

Los tumores evaden la vigilancia inmunitaria del huésped mediante una gran variedad de mecanismos. Varios de estos mecanismos se pueden debilitar mediante la inactivación de proteínas expresadas por los tumores y que son inmunodepresoras. Estas incluyen, entre otras, TGF- β (Kehrl et al. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200) y ligando Fas (Hahne et al. (1996) *Science* 274: 1363-1365). Los anticuerpos de cada una de estas entidades se pueden usar en combinación con anticuerpos anti-GITR para contrarrestar los efectos del agente inmunosupresor y favorecer las respuestas inmunitarias tumorales por parte del huésped.

Se pueden usar otros anticuerpos que activan la respuesta inmunitaria del huésped en combinación con anticuerpos anti-GITR. Estos incluyen moléculas en la superficie de células dendríticas, que activan la función de DC y la presentación de antígenos. Los anticuerpos anti-CD40 pueden sustituir eficazmente la actividad de los linfocitos T colaboradores (Ridge et al. (1998) *Nature* 393: 474-478) y se pueden usar junto con los anticuerpos anti-GITR. Los anticuerpos de activación a las moléculas coestimulantes de linfocitos T, tales como CTLA-4 (por ejemplo, patente estadounidense N.º 5.811.097), OX-40 (Weinberg et al. (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero et al. (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997) e ICOS (Hutloff et al. (1999) *Nature* 397: 262-266) también puede proporcionar mayores niveles de activación de linfocitos T. Los inhibidores de PD1 o PD-L1 también se pueden usar junto con un anticuerpo anti-GITR.

El trasplante de médula ósea se usa actualmente para tratar varios tumores de origen hematopoyético. Si bien la enfermedad del injerto contra el huésped es una consecuencia de este tratamiento, se puede obtener un beneficio terapéutico de las respuestas del injerto contra el tumor. La activación de GITR se puede usar para aumentar la eficacia de los linfocitos T específicos de tumor injertados en el donante.

También hay varios protocolos de tratamiento experimental que incluyen la activación y expansión *ex vivo* de linfocitos T específicos del antígeno y la transferencia adoptiva de estas células a receptores, a fin de estimular los linfocitos T específicos del antígeno contra los tumores (Greenberg & Riddell (1999) *Science* 285: 546-51). Estos métodos también se pueden usar para activar las respuestas de los linfocitos T a los agentes infecciosos, tales como CMV. La activación *ex vivo* en presencia de anticuerpos anti-GITR puede aumentar la frecuencia y la actividad de los linfocitos T transferidos de manera adoptiva.

Enfermedades infecciosas

Los métodos descritos en la presente también se pueden usar para tratar pacientes que estuvieron expuestos a ciertas toxinas o patógenos. En consecuencia, otro aspecto descrito en la presente proporciona un método para tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-GITR, o una porción de este de fijación al antígeno, de modo que el sujeto reciba tratamiento para la enfermedad infecciosa. De manera adicional o alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado.

De manera similar a su aplicación a tumores como se analizó anteriormente, la

activación de GTR mediado por anticuerpos se puede usar sola, o como adyuvante, en combinación con vacunas, para estimular la respuesta inmunitaria a patógenos, toxinas y autoantígenos. Los ejemplos de patógenos para los que este enfoque terapéutico puede ser particularmente útil incluyen patógenos para los que no hay en la actualidad una vacuna eficaz o patógenos para los cuales las vacunas convencionales no son totalmente eficaces. Estos incluyen, entre otros, VIH, hepatitis (A, B y C), influenza, herpes, giardia, malaria, leishmaniosis, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. La activación de GTR puede ser útil contra infecciones establecidas por agentes, tales como el VIH, que presentan antígenos alterados durante el curso de las infecciones. Estos epítomos novedosos se reconocen como extraños al momento de la administración de anticuerpos GTR antihumano, y por lo tanto, provocan una respuesta fuerte de linfocitos T.

Algunos ejemplos de virus patogénicos que causan infecciones que se pueden tratar mediante los métodos descritos en la presente incluyen VIH, hepatitis (A, B o C), virus del herpes (por ejemplo, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II y CMV, virus de Epstein Barr), adenovirus, virus de la influenza, flavivirus, virus ECHO, rinovirus, virus de Coxsackie, coronavirus, virus respiratorio sincicial, virus de la parotiditis, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubeola, parvovirus, viruela vacunoide, virus de HTLV, virus del dengue, virus del papiloma, virus del molusco contagioso, poliovirus, virus de la rabia, virus de John Cunningham y encefalitis causada por arbovirus.

Algunos ejemplos de bacterias patogénicas que causan infecciones que se pueden tratar mediante los métodos descritos en la presente incluyen clamidia, bacterias rickettsias, micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumonococos, meningococos y gonococos, *Klebsiella*, *próteo*, *Serratia*, *seudomonas*, *legionela*, *difteria*, *salmonela*, *bacilos*, *cólera*, *tétanos*, *botulismo*, *antrax*, *peste*, *leptospirosis* y bacterias de la enfermedad de Lyme.

Algunos ejemplos de hongos patogénicos que causan infecciones que se pueden tratar mediante los métodos descritos en la presente incluyen *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, etc.), género *Mucorales* (*Mucor*, *Absidia*, *Rhizophus*), *Sporothrix schenkii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*.

Algunos ejemplos de parásitos patogénicos que causan infecciones que se pueden tratar mediante los métodos descritos en la presente incluyen *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleriafowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*,

Cryptosporidium sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* y *Nippostrongylus brasiliensis*.

En todos los métodos anteriores, la activación de GITR se puede combinar con otras formas de inmunoterapia, tales como tratamiento de citocinas (por ejemplo, interferones, GM-CSF, G-CSF, IL-2) o terapia de anticuerpos biespecíficos, que proporciona una presentación mejorada de antígenos tumorales (véase, por ejemplo, Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Reacciones autoinmunitarias

Los anticuerpos anti-GITR pueden provocar y ampliar las respuestas autoinmunitarias. De hecho, la inducción de respuestas antitumorales mediante el uso de vacunas de péptidos y células tumorales revela que muchas respuestas antitumorales implican reactividad autoinmunitaria (van Elsas et al. (2001) *J. Exp. Med.* 194:481-489; Overwijk, et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 96: 2982-2987; Hurwitz, (2000) *supra*; Rosenberg & White (1996) *J. Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19 (1): 81-4). Por lo tanto, es posible considerar el uso de los anticuerpos anti-GITR junto con varias autoproteínas, a fin de elaborar protocolos de vacunación para generar eficazmente respuestas inmunitarias contra estas autoproteínas para el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer abarca la acumulación inadecuada de péptido A β en depósitos de amiloide en el cerebro; las respuestas de los anticuerpos contra el amiloide pueden limpiar estos depósitos de amiloide (Schenk et al., (1999) *Nature* 400: 173-177).

También se pueden usar como diana otras autoproteínas, tales como IgE, para el tratamiento de la alergia y el asma, y TNF α para la artritis reumatoide. Finalmente, las respuestas del anticuerpo a distintas hormonas se pueden inducir mediante el uso de anticuerpos anti-GITR. Las respuestas de los anticuerpos neutralizantes a las hormonas reproductoras se pueden usar para la anticoncepción. Las respuestas de los anticuerpos neutralizantes a las hormonas y otros factores solubles necesarios para el crecimiento de tumores particulares también se pueden considerar como posibles dianas de vacunación.

Los métodos análogos a los descritos anteriormente para el uso de anticuerpos anti-GITR se pueden usar para la inducción de respuestas autoinmunitarias terapéuticas en el tratamiento de pacientes que tienen una acumulación inadecuada

de otros autoantígenos, tales como depósitos de amiloide, lo que incluye A β en la enfermedad de Alzheimer, citocinas, tales como TNF α , e IgE.

Vacunas

Los anticuerpos anti-GITR descritos en la presente se pueden usar para estimular respuestas inmunitarias específicas del antígeno mediante la coadministración de un anticuerpo anti-GITR con un antígeno de interés (por ejemplo, una vacuna). En consecuencia, se proporcionan en la presente métodos para mejorar una respuesta inmunitaria a un antígeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto: (i) el antígeno; y (ii) un anticuerpo anti-GITR, o una porción de este de fijación al antígeno, de modo que se mejora la respuesta inmunitaria al antígeno en el sujeto. El anticuerpo puede ser un anticuerpo GITR antihumano (por ejemplo, cualquier anticuerpo anti-GITR humano descrito en la presente). De manera adicional o alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado. El antígeno puede ser, por ejemplo, un antígeno tumoral, un antígeno viral, un antígeno bacteriano o un antígeno de un patógeno. Los ejemplos no limitantes de esos antígenos incluyen los que se analizan en las secciones anteriores, tales como los antígenos tumorales (o vacunas contra tumores) analizados anteriormente, o los antígenos de virus, bacterias u otros patógenos descritos anteriormente.

En algunas formas de realización, un péptido o proteína de fusión que comprende el epítipo al cual se fija el anticuerpo anti-GITR se usa como una vacuna en forma adicional o alternativa a un anticuerpo anti-GITR.

Las vías adecuadas para administrar las composiciones de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) que se describen en la presente *in vivo* e *in vitro* son conocidas en el estado de la técnica, y que pueden seleccionar las personas del oficio de nivel medio. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos se pueden administrar mediante inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Las dosis adecuadas de las moléculas usadas dependerán de la edad y el peso del sujeto y de la concentración y/o la formulación de la composición de anticuerpos.

Como se describió anteriormente, los anticuerpos anti-GITR descritos en la presente se pueden coadministrar con uno o más agentes terapéuticos, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo se puede fijar al agente (como un inmunocomplejo) o se puede administrar de manera separada del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo se

puede administrar antes, después o en forma concurrente con el agente, o se puede coadministrar con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia contra el cáncer, por ejemplo, radiación. Los agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos, como doxorubicina (adriamicina), cisplatina, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucil, dacarbazina y ciclofosfamida hidroxiurea que, por sí solos, son eficaces únicamente a niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. La cisplatina se administra de manera intravenosa en dosis de 100 mg/ml una vez cada cuatro semanas, y la adriamicina se administra de manera intravenosa en una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La coadministración de anticuerpos anti-GITR, o los fragmentos de estos de fijación al antígeno, descritos en la presente con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes contra el cáncer que funcionan mediante diferentes mecanismos que producen un efecto citotóxico en las células tumorales humanas. La coadministración puede solucionar problemas debido al desarrollo de resistencia a los fármacos o a un cambio en la antigenicidad de las células tumorales, lo cual las volvería no reactivas con el anticuerpo.

Dentro del alcance descrito en la presente, también se encuentran kits que comprenden las composiciones de anticuerpos descritos en la presente (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas biespecíficas o multiespecíficas, o inmunoconjugados) e instrucciones de uso. El kit también puede contener al menos un reactivo adicional, o uno o más anticuerpos humanos adicionales descritos en la presente (por ejemplo, un anticuerpo humano con actividad complementaria que se fija a un epítipo en un antígeno GITR distinto del primer anticuerpo humano). En general, los kits incluyen una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit. El término "etiqueta" incluye cualquier leyenda o material grabado suministrado sobre el kit o junto con él, o que acompaña de otro modo al kit.

Terapias combinadas

Además de las terapias combinadas descritas anteriormente, los anticuerpos anti-GITR, por ejemplo, los descritos en la presente, también se pueden usar en terapia combinada, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer, como se describe más adelante.

En la presente se describen métodos de terapia combinada en donde un anticuerpo anti-GITR se coadministra con uno o más agentes adicionales, por ejemplo, fármacos de pequeñas moléculas, anticuerpos o porciones de estos de fijación al antígeno, que son efectivos para estimular respuestas inmunitarias para así mejorar,

estimular o regular de manera ascendente respuestas inmunitarias en un sujeto. Como se muestra en los Ejemplos, la administración de un anticuerpo anti-GITR agonista y un anticuerpo anti-PD-1 antagonista a ratones presentó un efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento tumoral.

En general, un anticuerpo anti-GITR, por ejemplo, que se describe en la presente, se puede combinar con (i) un agonista de una molécula estimuladora (por ejemplo, coestimuladora) (por ejemplo, receptor o ligando) y/o (ii) un antagonista de una señal o molécula inhibidora (por ejemplo, receptor o ligando) en células inmunitarias, tales como linfocitos T, ambos dan como resultado respuestas inmunitarias amplificadoras, tales como respuestas de linfocitos T específicos del antígeno. En algunos aspectos, un agente inmunooncológico es (i) un agonista de una molécula estimuladora (que incluye una coestimuladora) (por ejemplo, receptor o ligando) o (ii) un antagonista de una molécula inhibidora (que incluye una coinhibidora) (por ejemplo, receptor o ligando) en células que participan en la inmunidad innata, por ejemplo, células NK, y en donde el agente inmunooncológico mejora la inmunidad innata. Estos agentes inmunooncológicos frecuentemente se denominan reguladores del control inmunitario, por ejemplo, inhibidor del control inmunitario o estimulador del control inmunitario.

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR se administra con un agente que se dirige a una molécula estimuladora o inhibidora que es miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF). Por ejemplo, los anticuerpos anti-GITR, tal como los que se describen en la presente, se pueden administrar a un sujeto con un agente que se dirige a un miembro de la familia de IgSF para aumentar una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, un anticuerpo anti-GITR se puede administrar con un agente que se dirige (o se fija específicamente) a un miembro de la familia B7 de los ligandos fijados a la membrana que incluye B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) y B7-H6 o un receptor coestimulador o coinhibidor que se fija específicamente a un miembro de la familia B7.

Un anticuerpo anti-GITR también se puede administrar con un agente que se dirige a un miembro de la familia TNF y TNFR de moléculas (ligandos o receptores), tales como CD40 y CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT β R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDA1, EDA2, TNFR1, Linfotoxina α /TNF β , TNFR2, TNF α , LT β R, Linfotoxina α 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6,

TROY y NGFR (véase, por ejemplo, Tansey (2009) Drug Discovery Today 00:1).

Las respuestas de linfocitos T se pueden estimular mediante una combinación de anticuerpos anti-GITR que se describen en la presente, por ejemplo, 28F3.IgG1 y 28F3.IgG1.1, y uno o más de los siguientes agentes:

- (1) Un antagonista (inhibidor o agente de bloqueo) de una proteína que inhibe la activación de linfocitos T (por ejemplo, inhibidores del control inmunitario), tales como CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 y LAG-3, como se describió anteriormente, y cualquiera de las siguientes proteínas: TIM-3, Galectina 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, Galectina-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, B7-H3, B7-H4, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 y TIM-4; y/o
- (2) Un agonista de una proteína que estimula la activación de linfocitos T, tales como B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, CD70, CD27, CD40, DR3 y CD28H.

Los agentes ejemplificativos que modulan una de las proteínas anteriores y que se pueden combinar con anticuerpos anti-GITR agonistas, por ejemplo, los que se describen en la presente, para tratar el cáncer, incluyen: YervoyTM (ipilimumab) o Tremelimumab (a CTLA-4), galiximab (a B7.1), BMS-936558 (a PD-1), MK-3475 (a PD-1), AMP224 (a B7DC), BMS-936559 (a B7-H1), MPDL3280A (a B7-H1), MEDI-570 (a ICOS), AMG557 (a B7H2), MGA271 (a B7H3), IMP321 (a LAG-3), BMS-663513 (a CD137), PF-05082566 (a CD137), CDX-1127 (a CD27), anti-OX40 (Providence Health Services), huMAbOX40L (a OX40L), Atacicept (a TACI), CP-870893 (a CD40), Lucatumumab (a CD40), Dacetuzumab (a CD40), Muromonab-CD3 (a CD3), Ipilimumab (a CTLA-4).

Los anticuerpos anti-GITR también se pueden administrar con pidilizumab (CT-011), a pesar de que su especificidad para la fijación a PD-1 fue cuestionada.

Otras moléculas que se pueden combinar con anticuerpos anti-GITR agonistas para el tratamiento del cáncer incluyen antagonistas de receptores inhibidores en células NK o agonistas de los receptores activadores en células NK. Por ejemplo, los anticuerpos anti-GITR agonistas se pueden combinar con antagonistas de KIR (por ejemplo, lirilumab).

La activación de linfocitos T también se regula mediante citocinas solubles, y los anticuerpos anti-GITR se pueden administrar al sujeto, por ejemplo, que padece de cáncer, con antagonistas de citocinas que inhiben la activación de linfocitos T o los agonistas de citocinas que estimulan la activación de linfocitos T.

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-GITR se pueden usar en combinación con (i) antagonistas (o inhibidores o agentes de bloqueo) de proteínas de la familia de IgSF o la familia de B7 o la familia de TNF que inhiben la activación de linfocitos T o los antagonistas de las citocinas que inhiben la activación de linfocitos T (por ejemplo, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF; “citocinas inmunosupresoras”) y/o (ii) agonistas de receptores estimulantes de la familia de IgSF, la familia de B7 o la familia de TNF o de citocinas que estimulan la activación de linfocitos T, para estimular una respuesta inmunitaria, por ejemplo, para tratar enfermedades proliferativas, tales como el cáncer.

Aun otros agentes para terapias combinadas incluyen agentes que inhiben o reducen macrófagos o monocitos, que incluyen, entre otros, antagonistas CSF-1R, tales como anticuerpos CSF-1R antagonistas que incluyen RG7155 (WO11/70024, WO11/107553, WO11/131407, WO13/87699, WO13/119716, WO13/132044) o FPA-008 (WO11/140249; WO13169264; WO14/036357).

Los anticuerpos anti-GITR también se pueden administrar con agentes que inhiben la señalización de TGF- β .

Los agentes adicionales que se pueden combinar con un anticuerpo anti-GITR incluyen agentes que mejoran la presentación de antígenos tumorales, por ejemplo, vacunas de células dendríticas, GM-CSF que segrega vacunas celulares, oligonucleótidos CpG e imiquimod, o terapias que mejoran la inmunogenicidad de células tumorales (por ejemplo, antraciclinas).

Aun otras terapias que se pueden combinar con un anticuerpo anti-GITR incluyen terapias que reducen o bloquean las células Treg, por ejemplo, un agente que se fija específicamente a CD25.

Otra terapia que se puede combinar con un anticuerpo anti-GITR es una terapia que inhibe una enzima metabólica, tal como indoleamina dioxigenasa (IDO), dioxigenasa, arginasa o sintasa de óxido nítrico.

Otra clase de agentes que se pueden usar con un anticuerpo anti-GITR incluye agentes que inhiben la formación de adenosina o inhiben el receptor de adenosina A2A.

Otras terapias que se pueden combinar con un anticuerpo anti-GITR para tratar el cáncer incluyen terapias que revierten/evitan la anergia o el agotamiento de linfocitos T, y terapias que activan la activación inmunitaria innata y/o la inflamación en el sitio del tumor.

Un anticuerpo anti-GITR se puede combinar con más de un agente

inmunooncológico, y se puede, por ejemplo, combinar con un enfoque combinatorio que se dirige a elementos múltiples de la vía inmunitaria, tal como uno o más de los siguientes: una terapia que mejora la presentación de antígenos tumorales (por ejemplo, vacunas de células dendríticas, GM-CSF que segrega vacunas celulares, oligonucleótidos CpG, imiquimod); una terapia que inhibe la regulación inmunitaria negativa, por ejemplo, mediante inhibición de la vía de CTLA-4 y/o PD1/PD-L1/PD-L2 y/o reducción o bloqueo de Treg u otras células de supresión inmunitarias; una terapia que estimula la regulación inmunitaria positiva, por ejemplo, con agonistas que estimulan la vía de CD-137, OX-40 y/o GITR, y/o estimulan la función efectora de linfocitos T; una terapia que aumenta sistemáticamente la frecuencia de linfocitos T antitumorales; una terapia que reduce o inhibe Treg, tales como Treg en el tumor, por ejemplo, usando un antagonista de CD25 (por ejemplo, daclizumab) o mediante la reducción de microesferas anti-CD25 ex vivo; una terapia que tiene un impacto en la función de las células mieloides supresoras en el tumor; una terapia que mejora la inmunogenicidad de las células tumorales (por ejemplo, antraciclinas); linfocitos T adoptivos o transferencia de células NK, que incluyen células genéticamente modificadas, por ejemplo, células modificadas por receptores de antígenos quiméricos (terapia CAR-T); una terapia que inhibe una enzima metabólica, tal como indoleamina dioxigenasa (IDO), dioxigenasa, arginasa o sintasa de óxido nítrico; una terapia que revierte/evita la anergia o el agotamiento de linfocitos T, y terapias que desencadenan la activación inmunitaria innata y/o la inflamación en el sitio del tumor; la administración de citocinas estimuladoras inmunitarias o el bloqueo de citocinas represoras inmunitarias.

Los anticuerpos anti-GITR agonistas que se describen en la presente se pueden usar junto con uno o más agentes agonísticos que ligan receptores coestimulantes positivos, agentes de bloqueo que atenúan la señalización mediante receptores inhibidores, antagonistas, y uno o más agentes que aumentan sistemáticamente la frecuencia de linfocitos T antitumorales, agentes que superan distintas vías supresoras inmunitarias dentro del microentorno tumoral (por ejemplo, bloqueo del acoplamiento del receptor inhibidor, (por ejemplo, interacciones PD-L1/PD-1), reducción o inhibición de Treg (por ejemplo, usando un anticuerpo anti-CD25 monoclonal, (por ejemplo, daclizumab) o mediante reducción de microesferas anti-CD25 ex vivo), inhiben enzimas metabólicas, tales como IDO, o revierten/evitan la anergia o el agotamiento de linfocitos T y agentes que desencadenan la activación inmunitaria innata y/o la inflamación en el sitio del tumor.

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-GITR se administra a un sujeto junto con un inhibidor BRAF si el sujeto es mutación BRAF V600 positiva.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-GITR que se administra junto con otro anticuerpo inmunoestimulador es un anticuerpo que se describe en la presente. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-GITR que se administra junto con otro anticuerpo inmunoestimulador es un anticuerpo que tiene las secuencias CDR de 6C8, por ejemplo, un anticuerpo humanizado que tiene las CDR de 6C8, como se describió, por ejemplo, en WO2006/105021; un anticuerpo que comprende las CDR de un anticuerpo anti-GITR descrito en WO2011/028683; un anticuerpo que comprende las CDR de un anticuerpo anti-GITR descrito en JP2008278814, un anticuerpo que comprende las CDR de un anticuerpo anti-GITR descrito en WO2015/031667, u otro anticuerpo anti-GITR que se describe o se hace referencia en la presente.

En la presente se proporcionan métodos para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto una molécula anti-GITR agonista, por ejemplo, un anticuerpo, y uno o más anticuerpos inmunoestimuladores adicionales, tales como un anti-PD-1 antagonista, por ejemplo, un anticuerpo antagonista, un anti-PD-L1 antagonista, por ejemplo, un anticuerpo antagonista, un anti-CTLA-4 antagonista, por ejemplo, un anticuerpo antagonista y/o un anti-LAG3 antagonista, por ejemplo, un anticuerpo antagonista, de modo que en el sujeto se estimula una respuesta inmunitaria, por ejemplo para inhibir el crecimiento tumoral o estimular una respuesta antiviral. En una forma de realización, se le administra al sujeto un anticuerpo anti-GITR agonista y un anticuerpo anti-PD-1 antagonista. En una forma de realización, se le administra al sujeto un anticuerpo anti-GITR agonista y un anticuerpo anti-PD-L1 antagonista. En una forma de realización, se le administra al sujeto un anticuerpo anti-GITR agonista y un anticuerpo anti-CTLA-4 antagonista. En una forma de realización, el anticuerpo anti-GITR es un anticuerpo humano, tal como un anticuerpo descrito en la presente. De manera alternativa, el anticuerpo anti-GITR puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado (por ejemplo, preparado de un mAb anti-GITR de ratón), tal como los que se describen en la presente. En una forma de realización, al menos un anticuerpo inmunostimulador adicional (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1 antagonista, anti-PD-L1 antagonista, anti-CTLA-4 antagonista y/o anti-LAG3 antagonista) es un anticuerpo humano. De manera alternativa, al menos un anticuerpo inmunoestimulador adicional puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado (por ejemplo, preparado de un

anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA-4 y/o anti-LAG3 de ratón).

En la presente se proporcionan métodos para tratar una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer), que comprenden administrar a un sujeto un anticuerpo anti-GITR agonista y un anticuerpo PD-1 antagonista. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-GITR se administra en una dosis subterapéutica, el anticuerpo anti-PD-1 se administra en una dosis subterapéutica, o se administran ambos en una dosis subterapéutica. Asimismo, en la presente se proporcionan métodos para alterar un evento adverso asociado al tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulador, que comprenden administrar a un sujeto un anticuerpo anti-GITR y una dosis subterapéutica del anticuerpo anti-PD-1. En algunas formas de realización, el sujeto es un ser humano. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana y el anticuerpo anti-GITR es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana, tal como un anticuerpo que comprende las CDR o las regiones variables de 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 y 6G10 que se describen en la presente (por ejemplo, 28F3.IgG1 o 28F3.IgG1.1) u otro anticuerpo anti-GITR agonista que se describe en la presente.

Los antagonistas PD-1 adecuados para uso en los métodos que se describen en la presente, incluyen, entre otros, ligandos, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y anticuerpos biespecíficos) y agentes multivalentes. En una forma de realización, el antagonista PD-1 es una proteína de fusión, por ejemplo, una proteína de fusión Fc, tal como AMP-244. En una forma de realización, el antagonista PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1.

Un ejemplo de un anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab (BMS-936558) o un anticuerpo que comprende las CDR o las regiones variables de uno de los anticuerpos 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 7D3, 5F4 y 4A11 descritos en WO 2006/121168. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-PD1 es MK-3475 (Lambrolizumab) descrito en WO2012/145493; y AMP-514 descrito en WO 2012/145493. Otros anticuerpos PD-1 e inhibidores PD-1 conocidos incluyen los descritos en WO 2009/014708, WO 03/099196, WO 2009/114335, WO 2011/066389, WO 2011/161699, WO 2012/145493, la patente estadounidense N.^{os} 7,635,757 y 8,217,149, y la publicación de patente estadounidense N.º 2009/0317368. Se puede usar cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 descritos en WO2013/173223. Un anticuerpo anti-PD-1 que compite para fijarse con el mismo epítipo en PD-1 y/o se fija a este como uno de estos anticuerpos, también se puede usar en tratamientos combinados. Otro enfoque para dirigir el

receptor PD-1 es la proteína recombinante compuesta por el dominio extracelular de PD-L2 (B7-DC) fusionado a la porción Fc de IgG1, denominada AMP-224.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-1 se fija a PD-1 humano con una K_D de 5×10^{-8} M o menos, se fija a PD-1 humano con una K_D de 1×10^{-8} M o menos, se fija a PD-1 humano con una K_D de 5×10^{-9} M o menos, o se fija a PD-1 humano con una K_D de 1×10^{-8} M a 1×10^{-10} M o menos.

En la presente se proporcionan métodos para tratar una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer), que comprenden administrar a un sujeto un anticuerpo anti-GITR agonista y un anticuerpo PD-L1 antagonista. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-GITR se administra en una dosis subterapéutica, el anticuerpo anti-PD-L1 se administra en una dosis subterapéutica, o se administran ambos en una dosis subterapéutica. En la presente se proporcionan métodos para alterar un evento adverso asociado al tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulador, que comprenden administrar a un sujeto un anticuerpo anti-GITR y una dosis subterapéutica del anticuerpo anti-PD-L1. En algunas formas de realización, el sujeto es un ser humano. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana y el anticuerpo anti-GITR es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana, tal como un anticuerpo que comprende las CDR o las regiones variables de 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 y 6G10 que se describen en la presente (por ejemplo, 28F3.IgG1 o 28F3.IgG1.1) u otro anticuerpo anti-GITR agonista que se describe en la presente.

En una forma de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es BMS-936559 (denominado 12A4 en WO 2007/005874 y patente estadounidense N.º 7,943,743), o un anticuerpo que comprende las CDR o regiones variables de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 y 13G4, que se describen en la publicación PCT WO 07/005874 y la patente estadounidense N.º 7,943,743. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-PD-L1 es MEDI4736 también conocido como Anti-B7-H1), MPDL3280A (también conocido como RG7446), MSB0010718C (WO2013/79174) o rHigM12B7. También se pueden usar cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 descritos en WO2013/173223, WO2011/066389, WO2012/145493, patente estadounidense N.º 7,635,757 y 8,217,149 y publicación estadounidense N.º 2009/145493. Los anticuerpos anti-PD-L1 que compiten con el mismo epítipo y/o se fijan a este como el de cualquiera de estos anticuerpos también se pueden usar en los tratamientos combinados.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 se fija a PD-1 humano con una K_D de 5×10^{-8} M o menos, se fija a PD-L1 humano con una K_D de 1×10^{-8} M o menos, se fija a PD-L1 humano con una K_D de 5×10^{-9} M o menos, o se fija a PD-L1 humano con una K_D de 1×10^{-8} M a 1×10^{-10} M o menos.

En la presente se proporcionan métodos para tratar una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer), que comprenden administrar a un sujeto un anticuerpo anti-GITR que se describe en la presente y un anticuerpo CTLA-4 antagonista. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-GITR se administra en una dosis subterapéutica, el anticuerpo anti-CTLA-4 se administra en una dosis subterapéutica, o se administran ambos en una dosis subterapéutica. En la presente se proporcionan métodos para alterar un evento adverso asociado al tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulador, que comprenden administrar a un sujeto un anticuerpo anti-GITR y una dosis subterapéutica del anticuerpo anti-CTLA-4. En algunas formas de realización, el sujeto es un ser humano. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 es un anticuerpo seleccionado del grupo de: YervoyTM (ipilimumab o anticuerpo 10D1, descrito en la publicación PCT WO 01/14424), tremelimumab (anteriormente ticilimumab, CP-675,206), monoclonal o un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en cualquiera de las siguientes publicaciones: WO 98/42752; WO 00/37504; patente estadounidense No. 6.207.156; Hurwitz et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(17):10067-10071; Camacho et al. (2004) *J. Clin. Oncology* 22(145): Resumen N.º 2505 (anticuerpo CP-675206); y Mokyr et al. (1998) *Cancer Res.* 58:5301-5304. También se pueden usar cualquiera de los anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en WO2013/173223.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 se fija a CTLA-4 humano con una K_D de 5×10^{-8} M o menos, se fija a CTLA-4 humano con una K_D de 1×10^{-8} M o menos, se fija a CTLA-4 humano con una K_D de 5×10^{-9} M o menos, o se fija a CTLA-4 humano con una K_D de 1×10^{-8} M a 1×10^{-10} M o menos.

En la presente se proporcionan métodos para tratar una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer), que comprenden administrar a un sujeto un anticuerpo anti-GITR y un anticuerpo anti-LAG-3. En otras formas de realización, el anticuerpo anti-GITR se administra en una dosis subterapéutica, el anticuerpo anti-LAG-3 se administra en una dosis subterapéutica, o se administran ambos en una dosis subterapéutica. En la presente se proporcionan métodos para alterar un evento adverso asociado al tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulador, que comprenden administrar a un sujeto un anticuerpo anti-GITR y

una dosis subterapéutica del anticuerpo anti-LAG-3. En algunas formas de realización, el sujeto es un ser humano. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana y el anticuerpo anti-GITR es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana, tal como un anticuerpo que comprende las CDR o las regiones variables de 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 o 6G10 que se describen en la presente (por ejemplo, 28F3.IgG1 o 28F3.IgG1.1) u otro anticuerpo anti-GITR agonista que se describe en la presente. Los ejemplos de anticuerpos anti-LAG3 incluyen anticuerpos que comprenden las CDR o regiones variables de anticuerpos 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 o 17E5, que se describen en la publicación de las patentes estadounidenses N.^{os} US2011/0150892, WO10/19570 y WO2014/008218. En una forma de realización, un anticuerpo anti-LAG-3 es BMS-986016. Otros anticuerpos anti-LAG-3 reconocidos en el estado de la técnica que se pueden usar incluyen IMP731 y IMP-321, descritos en US 2011/007023, WO08/132601 y WO09/44273. Los anticuerpos anti-LAG-3 que compiten con el mismo epítipo y/o se fijan a este como el de cualquiera de estos anticuerpos también se pueden usar en los tratamientos combinados.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-LAG-3 se fija a LAG-3 humano con una K_D de 5×10^{-8} M o menos, se fija a LAG-3 humano con una K_D de 1×10^{-8} M o menos, se fija a LAG-3 humano con una K_D de 5×10^{-9} M o menos, o se fija a LAG-3 humano con una K_D de 1×10^{-8} M a 1×10^{-10} M o menos.

La administración de anticuerpos anti-GITR que se describen en la presente y los antagonistas, por ejemplo, anticuerpos antagonistas, a uno o más antígenos diana secundarios, tales como LAG-3 y/o CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1, puede mejorar la respuesta inmunitaria a las células cancerígenas en el paciente. Los tipos de cáncer cuyo crecimiento se puede inhibir mediante los anticuerpos de la presente descripción incluyen los tipos de cáncer que generalmente responden a la inmunoterapia y aquellos que no. Algunos ejemplos representativos de tipos de cáncer para el tratamiento con la terapia combinada de la presente descripción incluyen los tipos de cáncer enumerados en la presente.

En algunas formas de realización, la combinación de anticuerpos terapéuticos analizada en la presente se puede administrar simultáneamente como una sola combinación en un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o simultáneamente como composiciones separadas con cada anticuerpo en un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En otra forma de realización, la

combinación de anticuerpos terapéuticos se puede administrar en forma secuencial. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-GITR se pueden administrar en forma secuencial, por ejemplo, se puede administrar primero un anticuerpo anti-CTLA-4 y luego un segundo anticuerpo anti-GITR, o se puede administrar primero un anticuerpo anti-GITR y luego un anticuerpo anti-CTLA-4. De manera adicional o alternativa, un anticuerpo anti-PD-1 y un anticuerpo anti-GITR se pueden administrar en forma secuencial, por ejemplo, se puede administrar primero un anticuerpo anti-PD-1 y luego un anticuerpo anti-GITR, o se puede administrar primero un anticuerpo anti-GITR y luego un anticuerpo anti-PD-1. De manera adicional o alternativa, un anticuerpo anti-PD-L1 y un anticuerpo anti-GITR se pueden administrar en forma secuencial, por ejemplo, se puede administrar primero un anticuerpo anti-PD-L1 y luego un anticuerpo anti-GITR, o se puede administrar primero un anticuerpo anti-GITR y luego un anticuerpo anti-PD-L1. De manera adicional o alternativa, un anticuerpo anti-LAG-3 y un anticuerpo anti-GITR se pueden administrar en forma secuencial, por ejemplo, se puede administrar primero un anticuerpo anti-LAG-3 y luego un anticuerpo anti-GITR, o se puede administrar primero un anticuerpo anti-GITR y luego un anticuerpo anti-LAG-3.

Asimismo, si se administra en forma secuencial más de una dosis de la terapia combinada, el orden de la administración secuencial se puede invertir o mantener en el mismo orden en cada punto temporal de administración, las administraciones secuenciales se pueden combinar con administraciones simultáneas, o cualquier combinación de estas. Por ejemplo, la primera administración de un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-GITR combinados puede ser simultánea, la segunda administración puede ser secuencial con el anticuerpo anti-CTLA-4 primero y el anticuerpo anti-GITR segundo, y la tercera administración puede ser secuencial con el anticuerpo anti-GITR primero y el anticuerpo anti-CTLA-4 segundo, etc. De manera adicional o alternativa, la primera administración de un anticuerpo anti-PD-1 y un anticuerpo anti-GITR combinados puede ser simultánea, la segunda administración puede ser secuencial con un anticuerpo anti-PD-1 primero y anticuerpo anti-GITR segundo, y la tercera administración puede ser secuencial con el anticuerpo anti-GITR primero y el anticuerpo anti-PD-1 segundo, etc. De manera adicional o alternativa, la primera administración de un anticuerpo anti-PD-L1 y un anticuerpo anti-GITR combinados puede ser simultánea, la segunda administración puede ser secuencial con el anticuerpo anti-PD-L1 primero y el anticuerpo anti-GITR segundo, y la tercera administración puede ser secuencial con el anticuerpo anti-GITR primero y el

anticuerpo anti-PD-L1 segundo, etc. De manera adicional o alternativa, la primera administración de un anticuerpo anti-LAG-3 y un anticuerpo anti-GITR combinados puede ser simultánea, la segunda administración puede ser secuencial con un anticuerpo anti-LAG-3 primero y un anticuerpo anti-GITR segundo, y la tercera administración puede ser secuencial con un anticuerpo anti-GITR primero y un anticuerpo anti-LAG-3 segundo, etc. Otro esquema de dosificación representativo puede incluir una primera administración que sea secuencial con un anticuerpo anti-GITR primero y un anticuerpo anti-CTLA-4 (y/o anticuerpo anti-PD-1 y/o anticuerpo anti-PD-L1 y/o anticuerpo anti-LAG-3) segundo, y las administraciones posteriores pueden ser simultáneas.

En una forma de realización, un sujeto que tiene una enfermedad que se puede beneficiar de la estimulación del sistema inmunitario, por ejemplo, cáncer o una enfermedad infecciosa, se trata con administración al sujeto de un anticuerpo anti-GITR y un agente inmunooncológico, en donde el agente inmunooncológico es un agonista CD137 (4-1BB), tal como un anticuerpo agonístico CD137. Los anticuerpos CD137 adecuados incluyen, por ejemplo, urelumab o PF-05082566 (WO12/32433).

En una forma de realización, un sujeto que tiene una enfermedad que se puede beneficiar de la estimulación del sistema inmunitario, por ejemplo, cáncer o una enfermedad infecciosa, se trata con administración al sujeto de un anticuerpo anti-GITR y un agente inmunooncológico, en donde el agente inmunooncológico es un agonista OX40, tal como un anticuerpo OX40 agonístico. Los anticuerpos OX40 adecuados incluyen, por ejemplo, MEDI-6383, MEDI-6469 o MOXR0916 (RG7888; WO06/029879).

En una forma de realización, un sujeto que tiene una enfermedad que se puede beneficiar de la estimulación del sistema inmunitario, por ejemplo, cáncer o una enfermedad infecciosa, se trata con administración al sujeto de un anticuerpo anti-GITR y un agente inmunooncológico, en donde el agente inmunooncológico es un agonista CD40, tal como un anticuerpo CD40 agonístico. En algunas formas de realización, el agente inmunooncológico es un antagonista CD40, tal como un anticuerpo CD40 antagonístico. Los anticuerpos CD40 adecuados incluyen, por ejemplo, lucatumumab (HCD122), dacetuzumab (SGN-40), CP-870,893 o Chi Lob 7/4.

En una forma de realización, un sujeto que tiene una enfermedad que se puede beneficiar de la estimulación del sistema inmunitario, por ejemplo, cáncer o una enfermedad infecciosa, se trata con administración al sujeto de un anticuerpo anti-GITR y un agente inmunooncológico, en donde el agente inmunooncológico es un

agonista CD27, tal como un anticuerpo CD27 agonístico. Los anticuerpos CD27 adecuados incluyen, por ejemplo, varlilumab (CDX-1127).

En una forma de realización, un sujeto que tiene una enfermedad que se puede beneficiar de la estimulación del sistema inmunitario, por ejemplo, cáncer o una enfermedad infecciosa, se trata con administración al sujeto de un anticuerpo anti-GITR y un agente inmunooncológico, en donde el agente inmunooncológico es MGA271 (a B7H3) (WO11/109400).

En una forma de realización, un sujeto que tiene una enfermedad que se puede beneficiar de la estimulación del sistema inmunitario, por ejemplo, cáncer o una enfermedad infecciosa, se trata con administración al sujeto de un anticuerpo anti-GITR y un agente inmunooncológico, en donde el agente inmunooncológico es un antagonista KIR, tal como lirilumab.

En una forma de realización, un sujeto que tiene una enfermedad que se puede beneficiar de la estimulación del sistema inmunitario, por ejemplo, cáncer o una enfermedad infecciosa, se trata con administración al sujeto de un anticuerpo anti-GITR y un agente inmunooncológico, en donde el agente inmunooncológico es un antagonista IDO. Los antagonistas IDO adecuados incluyen, por ejemplo, INCB-024360 (WO2006/122150, WO07/75598, WO08/36653, WO08/36642), indoximod, NLG-919 (WO09/73620, WO09/1156652, WO11/56652, WO12/142237) o F001287.

En una forma de realización, un sujeto que tiene una enfermedad que se puede beneficiar de la estimulación del sistema inmunitario, por ejemplo, cáncer o una enfermedad infecciosa, se trata con administración al sujeto de un anticuerpo anti-GITR y un agente inmunooncológico, en donde el agente inmunooncológico es un agonista del receptor tipo Toll, por ejemplo, un agonista TLR2/4 (por ejemplo, Bacillus Calmette-Guerin); un agonista TLR7 (por ejemplo, Hiltonol o Imiquimod); un agonista TLR7/8 (por ejemplo, Resiquimod) o un agonista TLR9 (por ejemplo, CpG7909).

En una forma de realización, un sujeto que tiene una enfermedad que se puede beneficiar de la estimulación del sistema inmunitario, por ejemplo, cáncer o una enfermedad infecciosa, se trata con administración al sujeto de un anticuerpo anti-GITR y un agente inmunooncológico, en donde el agente inmunooncológico es un inhibidor de TGF- β , por ejemplo, GC1008, LY2157299, TEW7197 o IMC-TR1.

En un aspecto, un anticuerpo anti-GITR se administra de manera secuencial antes de la administración de un segundo agente, por ejemplo, un agente inmunooncológico. En un aspecto, un anticuerpo anti-GITR se administra de manera simultánea a la administración de un segundo agente, por ejemplo, un agente

inmunooncológico. Aun en otro aspecto, un anticuerpo anti-GITR se administra de manera secuencial después de la administración del segundo agente. La administración de los dos agentes puede comenzar en períodos de, por ejemplo, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 3 días, 5 días, 7 días, o una o más semanas de diferencia, o la administración de un segundo agente puede comenzar, por ejemplo, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 3 días, 5 días, 7 días, o una o más semanas luego de que se haya administrado el primer agente.

En algunos aspectos, un anticuerpo anti-GITR y un segundo agente, por ejemplo, un agente inmunooncológico, se administran de manera simultánea, por ejemplo, durante un período de 30 o 60 minutos, a un paciente. Un anticuerpo anti-GITR se puede coformular con un segundo agente, por ejemplo, un agente inmunooncológico.

Opcionalmente, un anti-GITR como agente inmunoterapéutico solo, o la combinación de un anticuerpo anti-GITR y uno o más anticuerpos inmunoterapéuticos (por ejemplo, bloqueo de anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-LAG-3) se pueden combinar adicionalmente con un agente inmunogénico, tal como células cancerígenas, antígenos tumorales purificados (que incluyen proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidratos), células y células transfectadas con genes que codifican las citocinas estimuladoras del sistema inmunitario (He et al. (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Los ejemplos de vacunas antitumorales que se pueden usar incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citocina GM-CSF (analizada más adelante). Una activación de GITR combinada y uno o más anticuerpos adicionales (por ejemplo, bloqueo de CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o LAG-3) también se pueden combinar adicionalmente con tratamientos estándares contra el cáncer. Por ejemplo, una activación de GITR combinada y uno o más anticuerpos adicionales (por ejemplo, bloqueo de CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o LAG-3) se pueden combinar de manera eficaz con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, es posible reducir la dosis de otro reactivo quimioterapéutico administrado en combinación con la presente descripción (Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Un ejemplo de dicha combinación es una combinación de anticuerpo anti-GITR agonista con o sin un anticuerpo adicional, tal como anticuerpos anti-CTLA-4 y/o anticuerpos anti-PD-1 y/o anticuerpos anti-PD-L1

y/o anticuerpos anti-LAG-3) combinados adicionalmente con decarbazina para el tratamiento de melanoma. Otro ejemplo es una combinación de anticuerpo anti-GITR con o sin anticuerpos anti-CTLA-4 y/o anticuerpos anti-PD-1 y/o anticuerpos anti-PD-L1 y/o LAG-3 combinados adicionalmente con interleucina-2 (IL-2) para el tratamiento de melanoma. Las razones científicas del uso combinado de la activación de GITR y el bloqueo de CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o LAG-3 con la quimioterapia consisten en que la muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos, debería provocar el aumento de los niveles de antígenos tumorales en la vía de presentación de antígenos. Otras terapias combinadas que pueden ocasionar sinergia con una activación de GITR combinada con o sin bloqueo de CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o LAG-3 a través de la muerte celular incluyen radiación, cirugía o la carencia hormonal. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el huésped. Los inhibidores de la angiogénesis también se pueden combinar con una activación de GITR combinada y un bloqueo de CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o LAG-3. La inhibición de la angiogénesis provoca la muerte de células tumorales, que puede ser una fuente de antígenos tumorales alimentados hacia las vías de presentación de antígenos del huésped.

Un anticuerpo anti-GITR agonista como agente inmunoterapéutico único, o una combinación de GITR agonístico y anticuerpos de bloqueo CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o LAG-3 también se puede usar en combinación con anticuerpos biespecíficos que dirigen las células efectoras que expresan los receptores Fc α o Fc γ hacia las células tumorales (véase, por ejemplo, patente estadounidense N.^{os} 5.922.845 y 5.837.243). Los anticuerpos biespecíficos se pueden usar para dirigir dos antígenos separados. El brazo de linfocitos T de estas respuestas se podría aumentar mediante el uso de una activación de GITR combinada y un bloqueo de CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o LAG-3.

En otro ejemplo, un anticuerpo anti-GITR agonista como un agente inmunoterapéutico solo o una combinación de un anticuerpo anti-GITR y un agente inmunoestimulante adicional, por ejemplo, anticuerpo anti-CTLA-4 y/o anticuerpo anti-PD-1 y/o anticuerpo anti-PD-L1 y/o agente LAG-3, por ejemplo, anticuerpo, se pueden usar junto con un anticuerpo antineoplásico, tal como Rituxan® (rituximab), Herceptin® (trastuzumab), Bexxar® (tositumomab), Zevalin® (ibritumomab), Campath® (alemtuzumab), Lymphocide® (epruzumab), Avastin® (bevacizumab) y Tarceva® (erlotinib), y similares. A modo de ejemplo y sin pretender limitarse a ninguna teoría, el tratamiento con un anticuerpo contra el cáncer o un anticuerpo contra el cáncer

conjugado con una toxina puede provocar la muerte de células cancerígenas (por ejemplo, células tumorales) que podrían potenciar una respuesta inmunitaria mediada por el agente inmunoestimulante, por ejemplo, agente GITR, CTLA-4, PD-1, PD-L1 o LAG-3, por ejemplo, anticuerpo. En una forma de realización de ejemplo, un tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, un tumor cancerígeno) puede incluir un agente contra el cáncer, por ejemplo, un anticuerpo, en combinación con anti-GITR y, opcionalmente, un agente inmunoestimulante adicional, por ejemplo, un agente anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-LAG-3, por ejemplo, un anticuerpo, de manera simultánea o secuencial o en cualquier combinación de estos, que pueda potenciar una respuesta inmunitaria antitumoral mediante el huésped.

Los tumores evaden la vigilancia inmunitaria del huésped mediante una gran variedad de mecanismos. Varios de estos mecanismos pueden debilitarse mediante la inactivación de las proteínas expresadas por los tumores y que son inmunosupresoras. Estas incluyen, entre otras, TGF- β (Kehrl *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200) y ligando Fas (Hahne *et al.* (1996) *Science* 274: 1363-1365). Los anticuerpos a cada una de estas entidades pueden además combinarse con un anticuerpo anti-GITR con o sin un agente inmunoestimulante adicional, por ejemplo, un agente anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-LAG-3, tal como un anticuerpo, para contrarrestar los efectos de los agentes inmunosupresores y favorecer las respuestas inmunitarias antitumorales mediante el huésped.

Otros agentes, por ejemplo, los anticuerpos, que se pueden usar para activar la respuesta inmunitaria del huésped, también se pueden usar junto con un anticuerpo anti-GITR con o sin un agente inmunoestimulante adicional, tal como un anticuerpo anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-LAG-3. Estos incluyen moléculas en la superficie de células dendríticas, que activan la función de DC y la presentación de antígenos. Los anticuerpos anti-CD40 (Ridge *et al.*, *supra*) se pueden usar junto con un anticuerpo anti-GITR y, opcionalmente, un agente inmunoestimulante adicional, por ejemplo, un agente anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-LAG-3, por ejemplo, anticuerpo. Otros anticuerpos activadores de las moléculas coestimuladoras de linfocitos T (Weinberg *et al.*, *supra*, Melero *et al.* *supra*, Hutloff *et al.*, *supra*, también pueden proporcionar mayores niveles de activación de linfocitos T.

Como se analizó anteriormente, el trasplante de médula ósea se usa actualmente para tratar varios tumores de origen hematopoyético. La inmunoterapia con anti-GITR sola o combinada con bloqueo de CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o LAG-

3 se puede usar para aumentar la eficacia de los linfocitos T específicos de tumor injertados en el donante.

Varios protocolos de tratamiento experimental incluyen la activación *ex vivo*, la expansión de linfocitos T específicos de antígeno y la transferencia adoptiva de estos linfocitos a receptores, a fin de estimular los linfocitos T específicos de antígeno contra el tumor (Greenberg & Riddell, *supra*). Estos métodos también se pueden usar para activar las respuestas de los linfocitos T a los agentes infecciosos, tales como CMV. Se prevé que la activación *ex vivo* en presencia de anticuerpos anti-GITR con o sin una terapia inmunoestimulante adicional, por ejemplo, anticuerpos anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-LAG-3, aumenta la frecuencia y la actividad de los linfocitos T transferidos de manera adoptiva.

En la presente se proporcionan métodos para alterar un evento adverso asociado al tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer) con un agente inmunoestimulador, que comprenden administrar a un sujeto un anticuerpo anti-GITR con o sin un agente anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-LAG-3, por ejemplo, anticuerpo. Por ejemplo, los métodos descritos en la presente proveen un método para reducir la incidencia de diarrea o colitis inducida por anticuerpos terapéuticos mediante la administración de un esteroide no absorbible al paciente. Como se usa en la presente, un "esteroide no absorbible" es un glucocorticoide que muestra un metabolismo amplio en la primera pasada, de modo que después del metabolismo en el hígado, la biodisponibilidad del esteroide sea baja, es decir, de menos de alrededor de 20 %. En una forma de realización descrita en la presente, el esteroide no absorbible es budesónida. La budesónida es un glucocorticoide de acción local, que es metabolizado en forma rápida, principalmente por el hígado, después de la administración oral. ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) es una formulación oral de budesónida dependiente del pH y del tiempo, desarrollada para optimizar la administración del fármaco al íleo y en el colon. ENTOCORT EC® está aprobado en los EE. UU. para el tratamiento de la enfermedad de Crohn de leve a moderada que afecta el íleo y/o el colon ascendente. La dosis oral habitual de ENTOCORT EC® para el tratamiento de la enfermedad de Crohn es de 6 a 9 mg/día. ENTOCORT EC® se libera en los intestinos antes de ser absorbido y retenido en la mucosa intestinal. Una vez que pasa a través del tejido diana de la mucosa intestinal, ENTOCORT EC® es ampliamente metabolizado por el sistema de citocromo P450 en el hígado con metabolitos que tienen una actividad de glucocorticoides insignificante. Por lo tanto, la biodisponibilidad es baja (de alrededor de 10 %). La baja biodisponibilidad de

budesónida da como resultado una relación terapéutica mejorada en comparación con otros glucocorticoides que tienen metabolismo de primera pasada menos rápido. La budesónida da como resultado menos cantidad de efectos adversos, lo que incluye una menor inhibición hipotalámica-hipofisaria, que los corticosteroides de acción sistemática. Sin embargo, la administración crónica de ENTOCORT EC® puede dar como resultado efectos glucocorticoides sistémicos, tales como hipercorticismismo e inhibición suprarrenal. Véase PDR 58.^a ed. 2004; 608-610.

Aun en otras formas de realización, la activación de GITR con o sin bloqueo de CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o LAG-3 (es decir, los anticuerpos terapéuticos inmunoestimuladores anti-GITR y, opcionalmente, los anticuerpos anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-LAG-3) junto con un esteroide no absorbible se puede combinar también con un salicilato. Los salicilatos incluyen agentes 5-ASA, tales como: sulfasalazine (AZULFIDINE®, Pharmacia & UpJohn); olsalazine (DIPENTUM®, Pharmacia & UpJohn); balsalazide (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.); y mesalamine (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA®, Shire US; CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA®, Solvay).

De acuerdo con los métodos descritos en la presente, un salicilato administrado en combinación con los anticuerpos anti-GITR con o sin los anticuerpos anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o LAG-3 y un esteroide no absorbible puede incluir la administración secuencial o superpuesta de salicilato y el esteroide no absorbible, a fin de disminuir la incidencia de colitis inducida por los anticuerpos inmunoestimuladores. Así, por ejemplo, los métodos para reducir la incidencia de colitis inducida por los anticuerpos inmunoestimuladores descritos en la presente abarcan administrar un salicilato y un esteroide no absorbible de manera simultánea o secuencial (por ejemplo, se administra un salicilato 6 horas después de un esteroide no absorbible), o cualquier combinación de estos. Asimismo, un salicilato y un esteroide no absorbible se pueden administrar por la misma vía (por ejemplo, ambos se administran de manera oral) o por vías diferentes (por ejemplo, un salicilato se administra de manera oral y un esteroide no absorbible se administra de manera rectal), que pueden ser diferentes de las vías usadas para administrar los anticuerpos anti-GITR y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-LAG-3.

Los anticuerpos anti-GITR y las terapias combinadas con anticuerpos que se describen en la presente también se pueden usar junto con otras terapias conocidas seleccionadas para su utilidad específica contra la indicación tratada (por ejemplo, cáncer). Las combinaciones de los anticuerpos anti-GITR que se describen en la

presente se pueden usar de manera secuencial con los agentes conocidos aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

Por ejemplo, los anticuerpos anti-GITR y las terapias combinadas con anticuerpos que se describen en la presente se pueden usar junto con (por ejemplo, de manera simultánea o separada) un tratamiento adicional, tal como irradiación, quimioterapia (por ejemplo, con camptotecina (CPT-11), 5-fluorouracilo (5-FU), cisplatina, doxorubicina, irinotecan, paclitaxel, gemcitabine, cisplatina, paclitaxel, carboplatin-paclitaxel (Taxol), doxorubicina, 5-fu o camptotecina + apo2l/TRAIL (a 6X combo)), uno o más inhibidores de proteasoma (por ejemplo, bortezomib o MG132), uno o más inhibidores de Bcl-2 (por ejemplo, BH3l-2' (inhibidor de bcl-xl),inhibidor de indoleamina dioxigenasa-1 (por ejemplo, INCB24360, indoximod, NLG-919, o F001287), AT-101 (derivado de R-(-)-gossypol), ABT-263 (molécula pequeña), GX-15-070 (obatoclax) o antagonistas de MCL-1 (proteína de diferenciación celular de leucemia mieloide-1), antagonistas de IAP (inhibidor de la proteína apoptosis), por ejemplo, smac7, smac4, mimética de smac de molécula pequeña, péptidos de smac sintéticos (véase Fulda *et al.*, *Nat Med* 2002;8:808-15), ISIS23722 (LY2181308) o AEG-35156 (GEM-640)), inhibidores de HDAC (histona desacetilasa), anticuerpos anti-CD20 (por ejemplo, rituximab), inhibidores de angiogénesis (por ejemplo, bevacizumab), agentes anti-angiogénicos que se dirigen a VEGF y VEGFR (por ejemplo, Avastin), triterpenoides sintéticos (véase Hyer *et al.*, *Cancer Research* 2005;65:4799-808), moduladores de c-FLIP (inhibidor celular proteico de FLICE) (por ejemplo, ligandos naturales y sintéticos de PPAR γ (receptor γ activado por proliferadores de peroxisomales), 5809354 o 5569100), inhibidores de quinasa (por ejemplo, Sorafenib), Trastuzumab, Cetuximab, Temsirolimus, inhibidores de mTOR, tales como rapamycin y temsirolimus, Bortezomib, inhibidores de JAK2, inhibidores de HSP90, inhibidores de PI3K-AKT, lenalidomida, inhibidores de GSK3 β , inhibidores de IAP y/o fármacos genotóxicos.

Los anticuerpos anti-GITR y las terapias combinadas con anticuerpos que se describen en la presente también se pueden usar junto con uno o más agentes citotóxicos antiproliferativos. Las clases de compuestos que se pueden usar como agentes citotóxicos antiproliferativos incluyen, entre otros, los siguientes:

Agentes alquilantes (que incluyen, entre otros, mostazas de nitrógeno, derivados de etilenimina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas y triazenos): mostaza de uracilo, clormetina, ciclofosfamida (CYTOXANTM) fosfamida, Melphalan, Chlorambucil, Pipobroman, trietilenmelamina, Trietilentiofosforamina, Busulfan, Carmustine,

Lomustine, Streptozocin, Dacarbazina y Temozolomide.

Antimetabolitos (que incluyen, entre otros, antagonistas del ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina deaminasa): methotrexate, 5-fluorouracilo, floxuridine, cytarabine, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fludarabine fosfato, pentostatina y gemcitabine.

Los agentes antiproliferativos adecuados para combinar con anticuerpos anti-GITR agonistas, entre otros, taxanos, paclitaxel (paclitaxel está disponible en el comercio como TAXOLTM), docetaxel, discodermolide (DDM), dictyostatin (DCT), peloruside A, epotilonas, epotilona A, epotilona B, epotilona C, epotilona D, epotilona E, epotilona F, furanoepotilona D, desoxiepotilona BI, [17]-dehidrodesoxiepotilona B, [18]dehidrodesoxiepotilonas B, C12,13-ciclopropil-epotilona A, C6-C8 epotilona A en puente, trans-9,10-dehidroepotilona D, cis-9,10-dehidroepotilona D, 16-desmetilepotilona B, epotilona B10, discoderomolide, patupilona (EPO-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-EPO, ABJ-789, XAA296A (discodermolide), TZT-1027 (soblidotin), ILX-651 (clorhidrato de tasidotina), halichondrin B, mesilato de Eribulin (E-7389), hemiasterlina (HTI-286), E-7974, criptoficinas, LY-355703, inmunoconjugados de maitansinoides (DM-1), MKC-1, ABT-751, T1-38067, T-900607, SB-715992 (ispinesib), SB-743921, MK-0731, STA-5312, eleutherobin, 17beta-acetoxi-2-etoxi-6-oxo-B-homoestra-1,3,5(10)-trien-3-ol, ciclostreptina, isolaulimalida, laulimalida, 4-epi-7-dehidroxi-14,16-didemetil-(+)-discodermolidas y criptotilona 1, además de otros agentes estabilizantes de microtubulina conocidos en el estado de la técnica.

En casos en donde es deseable hacer que las células proliferativas se vuelvan inactivas de manera anormal junto con o antes del tratamiento con los anticuerpos anti-GITR que se describen en la presente, hormonas y esteroides (que incluyen análogos sintéticos), tales como 17a-etinilestradiol, dietilstilbestrol, testosterona, prednisone, fluoxymesterone, propionato de dromostanolona, testolactona, megestrolacetato, metilprednisolona, metil-testosterona, prednisolona, triamcinolona, clorotrianiseno, hidroxiprogesterona, aminoglutetimida, estramustine, medroxiprogesterona acetato, leuprolide, flutamide, toremifene, ZOLADEXTM, también se pueden administrar al paciente. Al usar los métodos o las composiciones que se describen en la presente, otros agentes usados en la modulación del crecimiento del tumor o la metástasis en un marco clínico, tal como antimiméticos, también se pueden administrar según se desea.

Los métodos para la administración segura y eficaz de los agentes quimioterapéuticos son conocidos por las personas del oficio de nivel medio. Además,

su administración se describe en la literatura estándar. Por ejemplo, la administración de muchos agentes quimioterapéuticos se describe en Physicians' Desk Reference (PDR), por ejemplo, edición 1996 (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA); cuya descripción se incorpora en la presente por referencia.

Los agentes quimioterapéuticos y/o la terapia de radiación se pueden administrar de acuerdo con los protocolos terapéuticos conocidos en el estado de la técnica. Será evidente para las personas del oficio de nivel medio que la administración de los agentes quimioterapéuticos y/o la terapia de radiación pueden variar según la enfermedad tratada y los efectos conocidos de los agentes quimioterapéuticos y/o la terapia de radiación en esa enfermedad. Asimismo, de acuerdo con el conocimiento del médico experto, los protocolos terapéuticos (por ejemplo, las cantidades de dosis y los tiempos de administración) se pueden modificar en vista de los efectos observados de los agentes terapéuticos administrados en el paciente, y en vista de las respuestas observadas de la enfermedad a los agentes terapéuticos administrados.

FORMAS DE REALIZACIÓN DE EJEMPLO

1. Un anticuerpo aislado, o una porción de fijación al antígeno de este, que se fija al receptor de TNF inducible por glucocorticoides (GITR) humano y muestra las siguientes propiedades:

- (a) se fija a GITR humano soluble;
- (b) se fija a GITR humano unido a la membrana;
- (c) se fija a GITR de *Macaca fascicularis* unido a la membrana;
- (d) induce o mejora la activación de linfocitos T;
- (e) inhibe la fijación del ligando GITR a GITR en células 3A9-hGITR;
- (f) inhibe parcialmente, como máximo, la fijación del ligando GITR a GITR en linfocitos T activados;
- (g) se fija a un epítipo conformacional en GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4);
- (h) se fija a GITR humano no glucosilado y glucosilado ligado a N y ligado a O;
- (i) tiene actividad agonista en ausencia de fijación a un receptor Fc, pero en donde la fijación a un receptor Fc también mejora la actividad agonista; y
- (i) compete en cualquier dirección o en ambas direcciones, para fijarse a GITR humano, con uno o más de los anticuerpos 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 y 6G10.

2. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la

forma de realización 1, en donde el anticuerpo estimula una respuesta inmunitaria antitumoral.

3. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, en donde el anticuerpo estimula una respuesta de linfocitos T específicos del antígeno.

4. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde el anticuerpo aumenta la producción de IL-2 y/o IFN- γ en linfocitos T que expresan GITR.

5. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde el anticuerpo aumenta la proliferación de linfocitos T.

6. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde el anticuerpo no se fija a receptores Fc.

7. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-5, en donde el anticuerpo se fija a uno o más Fc γ R activadores.

8. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde el anticuerpo se fija a GITR humano soluble con una K_D de 10 nM o menos, según la medición mediante Biacore.

9. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde el anticuerpo se fija a GITR humano unido a la membrana con una K_D de 1 nM o menos, según la medición mediante Scatchard.

10. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde el anticuerpo se fija a GITR humano unido a la membrana con un EC_{50} de 1 nM o menos, según la medición mediante FACS.

11. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde el anticuerpo se fija a GITR de *Macaca fascicularis* unido a la membrana con un EC_{50} de 10 nM o menos, según la medición mediante FACS.

12. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde el anticuerpo induce o

mejora la activación de linfocitos T sin requerir reticulación multivalente.

13. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde el anticuerpo inhibe la fijación del ligando GITR a GITR con un EC_{50} de 1 $\mu\text{g/ml}$ o menos, según medición de FACS.

14. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde el anticuerpo se fija a PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) y CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218) de GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4).

15. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente al receptor de TNF inducible por glucocorticoides (GITR), y que comprende las tres CDR de la cadena pesada variable y las tres CDR de la cadena liviana variable, que se encuentran en los pares de la cadena pesada variable y la cadena liviana variable, seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) SEQ ID NO: 13 y 14;
- (b) SEQ ID NO: 26 y 27;
- (c) SEQ ID NO: 39 y 40;
- (d) SEQ ID NO: 52 y 53;
- (e) SEQ ID NO: 52 y 54;
- (f) SEQ ID NO: 71 y 72;
- (g) SEQ ID NO: 84 y 85;
- (h) SEQ ID NO: 97 y 98;
- (i) SEQ ID NO: 97 y 99;
- (j) SEQ ID NO: 115 y 116;
- (k) SEQ ID NO: 128 y 129;
- (l) SEQ ID NO: 128 y 130; y
- (m) SEQ ID NO: 335 y 336.

16. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de fijación al antígeno de este, que se fija al receptor de TNF inducible por glucocorticoides (GITR) que comprende:

(a) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 20, 21 y 22, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 23, 24 y 25, respectivamente;

(b) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 33, 34 y 35, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la

cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente;

(c) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 46, 47 y 48, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 49, 50 y 51, respectivamente;

(d) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 62, 63 y 64, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 65, 66 y 67, respectivamente;

(e) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 62, 63 y 64, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 68, 69 y 70, respectivamente;

(f) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 78, 79 y 80, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 81, 82 y 83, respectivamente;

(g) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 91, 92 y 93, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 94, 95 y 96, respectivamente;

(h) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 106, 107 y 108, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 109, 110 y 111, respectivamente;

(i) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 106, 107 y 108, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 112, 113 y 114, respectivamente;

(j) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 122, 123 y 124, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 125, 126 y 127, respectivamente;

(k) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 138, 139 y 140, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 141, 142 y 143, respectivamente;

(l) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 138, 139 y 140, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 144, 145 y 146, respectivamente; o

(m) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 342, 343 y 344, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 345, 346 y 347, respectivamente.

17. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la

forma de realización 16, en donde el anticuerpo comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 20, 21 y 22, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 23, 24 y 25, respectivamente.

18. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la forma de realización 16, en donde el anticuerpo comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 33, 34 y 35, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente.

19. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la forma de realización 16, en donde el anticuerpo comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 46, 47 y 48, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 49, 50 y 51, respectivamente.

20. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de fijación al antígeno de este, que se fija al receptor de TNF inducible por glucocorticoides (GITR) y comprende regiones variables de la cadena liviana y pesada, en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, 26, 39, 52, 71, 84, 97, 115, 128 y 335.

21. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de fijación al antígeno de este, que se fija al receptor de TNF inducible por glucocorticoides (GITR) y comprende regiones variables de la cadena liviana y pesada, en donde la región variable de la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, 27, 40, 53, 54, 72, 85, 98, 99, 116, 129, 130 y 336.

22. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de fijación al antígeno de este, que se fija al receptor de TNF inducible por glucocorticoides (GITR) y comprende secuencias de regiones variables de la cadena liviana y pesada al menos 85 % idénticas a las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente;
- (b) SEQ ID NO: 26 y 27, respectivamente;
- (c) SEQ ID NO: 39 y 40, respectivamente;
- (d) SEQ ID NO: 52 y 53, respectivamente;
- (e) SEQ ID NO: 52 y 54, respectivamente;

- (f) SEQ ID NO: 71 y 72, respectivamente;
- (g) SEQ ID NO: 84 y 85, respectivamente;
- (h) SEQ ID NO: 97 y 98, respectivamente;
- (i) SEQ ID NO: 97 y 99, respectivamente;
- (j) SEQ ID NO: 115 y 116, respectivamente;
- (k) SEQ ID NO: 128 y 129, respectivamente;
- (l) SEQ ID NO: 128 y 130, respectivamente; y
- (m) SEQ ID NO: 335 y 336, respectivamente.

23. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la forma de realización 22, en donde las regiones variables de la cadena liviana y pesada comprenden una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a las regiones variables de la cadena liviana y pesada seleccionadas del grupo que consiste en (a)-(m).

24. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la forma de realización 23, en donde la región variable de la cadena liviana y pesada comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a las regiones variables de la cadena liviana y pesada seleccionadas del grupo que consiste en (a)-(m).

25. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la forma de realización 24, en donde la región variable de la cadena pesada y liviana comprende las regiones variables de la cadena pesada y liviana seleccionadas del grupo que consiste en (a)-(m).

26. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la forma de realización 25, en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO: 13 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO: 14.

27. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la forma de realización 25, en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO: 26 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO: 27.

28. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la forma de realización 25, en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID

NO: 39 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO: 40.

29. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de fijación al antígeno de este, que se fija al receptor de TNF inducible por glucocorticoides (GITR) y comprende secuencias de la cadena liviana o pesada al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) SEQ ID NO: 15 y 16, respectivamente;
- (b) SEQ ID NO: 17 y 19, respectivamente;
- (c) SEQ ID NO: 18 y 19, respectivamente;
- (d) SEQ ID NO: 28 y 29, respectivamente;
- (e) SEQ ID NO: 30 y 32, respectivamente;
- (f) SEQ ID NO: 31 y 32, respectivamente;
- (g) SEQ ID NO: 41 y 42, respectivamente;
- (h) SEQ ID NO: 43 y 45, respectivamente;
- (i) SEQ ID NO: 44 y 45, respectivamente;
- (j) SEQ ID NO: 55 y 56, respectivamente;
- (k) SEQ ID NO: 55 y 57, respectivamente;
- (l) SEQ ID NO: 58 y 60, respectivamente;
- (m) SEQ ID NO: 59 y 60, respectivamente;
- (n) SEQ ID NO: 58 y 61, respectivamente;
- (o) SEQ ID NO: 59 y 61, respectivamente;
- (p) SEQ ID NO: 73 y 74, respectivamente;
- (q) SEQ ID NO: 75 y 77, respectivamente;
- (r) SEQ ID NO: 76 y 77, respectivamente;
- (s) SEQ ID NO: 86 y 87, respectivamente;
- (t) SEQ ID NO: 88 y 90, respectivamente;
- (u) SEQ ID NO: 89 y 90, respectivamente;
- (v) SEQ ID NO: 102 y 104, respectivamente;
- (w) SEQ ID NO: 103 y 104, respectivamente;
- (x) SEQ ID NO: 100 y 101, respectivamente;
- (y) SEQ ID NO: 100 y 371, respectivamente;
- (z) SEQ ID NO: 102 y 105, respectivamente;
- (za) SEQ ID NO: 103 y 105, respectivamente;
- (zb) SEQ ID NO: 117 y 118, respectivamente;

(zc) SEQ ID NO: 119 y 121, respectivamente;
 (zd) SEQ ID NO: 120 y 121, respectivamente;
 (ze) SEQ ID NO: 131 y 132, respectivamente;
 (zf) SEQ ID NO: 134 y 136, respectivamente;
 (zg) SEQ ID NO: 135 y 136, respectivamente;
 (zh) SEQ ID NO: 131 y 133, respectivamente;
 (zi) SEQ ID NO: 134 y 137, respectivamente;
 (zj) SEQ ID NO: 135 y 137, respectivamente;
 (zk) SEQ ID NO: 337 y 338, respectivamente;
 (zl) SEQ ID NO: 339 y 341, respectivamente; y
 (zm) SEQ ID NO: 340 y 341, respectivamente.

30. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la forma de realización 29, en donde las cadenas pesadas y livianas comprenden las cadenas pesadas y livianas seleccionadas del grupo que consiste en (a)-(zm).

31. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la forma de realización 30, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO: 17 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO: 19.

32. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la forma de realización 30, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO: 18 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO: 19.

33. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de fijación al antígeno de este, que (a) se fija al mismo epítipo en GITR que en el anticuerpo de acuerdo con la forma de realización 25, y (b) inhibe la fijación del anticuerpo de acuerdo con la forma de realización 25 a GITR en linfocitos T activados al menos un 90 % según mediciones mediante FACS.

34. el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 15-33, en donde el anticuerpo se fija a PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) y CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218) de GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4).

35. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 15-34, en donde el anticuerpo se fija a GITR

humano y de *Macaca fascicularis*.

36. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o una variante de estas.

37. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la forma de realización 36, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG1.

38. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la forma de realización 36, en donde el anticuerpo comprende un Fc de IgG1 no efector.

39. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la forma de realización 38, en donde el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, comprende un Fc de IgG1 no efector que comprende las siguientes mutaciones: L234A, L235E, G237A, A330S y P331S.

40. El anticuerpo de acuerdo con la forma de realización 36, en donde el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, comprende un Fc con fijación mejorada a un FcγR activador.

41. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde los residuos de metionina en las regiones CDR se sustituyen por residuos de aminoácidos que no se someten a oxidación.

42. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 15-41, en donde el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, es un anticuerpo humano o humanizado.

43. Una molécula biespecífica que comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores ligado a una molécula que tiene una segunda especificidad de fijación.

44. Un ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena pesada y/o liviana del anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-42.

45. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la forma de realización 44.

46. Una célula transformada con un vector de expresión de acuerdo con la forma de realización 45.

47. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-42 ligado a un agente.

48. Una composición que comprende el anticuerpo, o una porción de fijación al

antígeno de este, una molécula biespecífica o un inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-43 y 47, y un portador.

49. Un kit que comprende el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, o una molécula biespecífica o inmunoconjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-43 y 47 e instrucciones de uso.

50. Un método para preparar un anticuerpo anti-GITR, o una porción de fijación al antígeno de este, que comprende expresar el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, en la célula de acuerdo con la forma de realización 46 y aislar el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de la célula.

51. Un método para estimular una respuesta de linfocitos T específicos del antígeno que comprende poner en contacto el linfocito T con el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, una molécula biespecífica o un inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-43 y 47 de modo que la respuesta de linfocitos T específicos del antígeno se estimule.

52. Un método para activar o coestimular un linfocito T efector, que comprende poner en contacto un linfocito T efector con un anticuerpo anti-GITR, o una porción de fijación al antígeno de este, una molécula biespecífica o un inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-43 y 47 y CD3, en donde el linfocito T efector se activa o coestimula.

53. Un método para aumentar la producción de IL-2 y/o IFN- γ en un linfocito T que comprende poner en contacto el linfocito T con una cantidad eficaz del anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, una molécula bioespecífica o un inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-43 y 47.

54. Un método para aumentar la proliferación de linfocitos T que comprende poner en contacto el linfocito con una cantidad eficaz del anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, una molécula biespecífica o un inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-43 y 47.

55. Un método para aumentar la producción de IL-2 y/o IFN- γ en linfocitos T en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz del anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, una molécula biespecífica o un inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-43 y 47, para aumentar la producción de IL-2 y/o IFN- γ en linfocitos T.

56. Un método para reducir o disminuir la cantidad de linfocitos T reguladores en un tumor de un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, una molécula

biespecífica o un inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-43 y 47, en donde el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, tiene una función efectora o efectora mejorada, para reducir la cantidad de linfocitos T reguladores en el tumor.

57. Un método para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, la molécula biespecífica o el inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-43 y 47, de manera que se estimule una respuesta inmunitaria en el sujeto.

58. El método de acuerdo con la forma de realización 57, en donde el sujeto tiene un tumor, y se estimula una respuesta inmunitaria contra el tumor.

59. Un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto, que comprende administrarle al sujeto el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, la molécula biespecífica o el inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-43 y 47, de manera que se inhiba el crecimiento tumoral en el sujeto.

60. Un método para tratar el cáncer que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, la molécula biespecífica o el inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-43 y 47, para tratar el cáncer.

61. El método de acuerdo con la forma de realización 60, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer útero/cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de esófago, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de células germinales, cáncer óseo, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer de piel, neoplasma del sistema nervioso central, linfoma, leucemia, mieloma, sarcoma y cáncer relacionado con virus.

62. El método de acuerdo con las formas de realización 60 o 61, en donde el cáncer es un cáncer metastásico, cáncer refractario o cáncer recurrente.

63. El método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 56-62, que también comprende administrar uno o más tratamientos adicionales.

64. El método de acuerdo con la forma de realización 63, en donde el tratamiento adicional es un anticuerpo anti-PD1, un anticuerpo LAG-3, un anticuerpo CTLA-4 o un anticuerpo PD-L1.

65. Un método para detectar la presencia del receptor TNF inducible por glucocorticoides (GITR) en una muestra que comprende poner en contacto la muestra con el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-42, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, y GITR, y detectar la formación de un complejo.

66. Un anticuerpo anti-GITR aislado que comprende una región constante de la cadena pesada modificada que comprende una bisagra de IgG2 y al menos uno de CH1, CH2 y CH3 que no es un isotipo IgG2, en donde el anticuerpo anti-GITR tiene actividad agonista mejorada con respecto al mismo anticuerpo anti-GITR pero con una bisagra de no IgG2.

67. El anticuerpo anti-GITR aislado de acuerdo con la forma de realización 66, en donde la región constante de la cadena pesada modificada comprende una región constante de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 223-226 y 283-290, o una región constante de la cadena pesada que difiere de aquella en, como máximo, 5 aminoácidos o es al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 223-226 y 283-290.

68. El anticuerpo anti-GITR aislado de acuerdo con la forma de realización 67, en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 17, 18, 28, 30, 31, 41, 43, 44, 55, 58, 59, 73, 75, 76, 86, 88, 89, 100, 102, 103, 117, 119, 120, 131, 134, 135, 227-275, 337, 339, 340, 348-352, 361 y 362, o una cadena pesada que difiere de aquella en, como máximo, 10 aminoácidos o es al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, 17, 18, 28, 30, 31, 41, 43, 44, 55, 58, 59, 73, 75, 76, 86, 88, 89, 100, 102, 103, 117, 119, 120, 131, 134, 135, 227-275, 337, 339, 340, 348-352, 361 y 362.

La presente descripción también se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes. El contenido de todas las figuras y todas las referencias, secuencias de Genbank, patentes y solicitudes de patentes publicadas citadas en la presente solicitud se incorporan expresamente en la presente como referencia. En particular, las descripciones de las publicaciones PCT WO 09/045957, WO 09/073533, WO 09/073546, WO 09/054863 y PCT/US2013/072918, y de la solicitud de patente estadounidense N.º 2011/0150892 se incorporan expresamente en la presente como referencia.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación de diferentes anticuerpos anti-GITR

Los anticuerpos monoclonales anti-GITR humanos se generaron en las cepas Hco7, Hco27, Hco20, Hco12, Hco17 y Hc2 de ratones transgénicos HuMAb® (“HuMAb” es una marca registrada de Medarex, Inc., Princeton, Nueva Jersey) y ratones KM (la cepa KM Mouse® contiene el transcromosoma SC20 como descrito en la publicación PCT WO 02/43478). Los ratones HuMAb y KM HC2/KCo27 se generaron como se describe en las patentes estadounidenses N.ºs 5.770.429 y 5.545.806, cuyas descripciones se incorporan en su totalidad en la presente por referencia.

Un total de 94 ratones, incluso 7 genotipos de ratones transgénicos (KM, Hco7, Hco27, Hco20, Hco12, Hco17 y Hc2), se inmunizaron mediante diferentes estrategias de inmunización (diferente antígeno, diferente dosis, duración, vías de administración (en almohadillas plantares (fp), vías intraperitoneal (ip) y subcutánea (sc), y adyuvante (CFA/IFA, Ribi y anticuerpos), etc). Se realizaron y se analizaron 36 fusiones de 54 ratones. Se identificaron 157 anticuerpos de estas 36 fusiones, y la caracterización adicional produjo el aislamiento de anticuerpos de interés particular, que incluyen los anticuerpos designados como 28F3, 19D3, 18E10, 3C3, 2G6, 8A6, 9G7, 14E3, 19H8 y 6G10.

La secuenciación de cADN identificó una cadena pesada y una liviana en cada uno de los anticuerpos 28F3, 19D3, 18D10, 2G6, 8A6, 14E3 y 6G10, y una cadena pesada y dos cadenas livianas (cadena liviana 1 o “L1” y cadena liviana 2 o “L2”) en cada uno de los anticuerpos 3C3, 9G7 y 19H8. Mediante análisis de proteínas, se identificó una cadena liviana simple en los anticuerpos 3C3 y 9G7, y la secuenciación del terminal N y la determinación del peso molecular indicaron que era la cadena liviana L1 en 3C3 y la cadena liviana L2 en 9G7. Con respecto al anticuerpo 19H8, el 93 % de los anticuerpos expresados por el hibridoma contenían cadena liviana L1, y 3 % contenían cadena liviana L2. Los anticuerpos 3C3-1 y 3C3-2 corresponden al anticuerpo 3C3 con una cadena liviana L1 y L2, respectivamente. Los anticuerpos 9G7-1 y 9G7-2 corresponden al anticuerpo 9G73 con una cadena liviana L1 y L2, respectivamente. Los anticuerpos 19H8-1 y 19H8-2 corresponden al anticuerpo 19H8 con una cadena liviana L1 y L2, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de cada una de las cadenas livianas de los 3 anticuerpos se proporcionan en la Tabla 11.

Las secuencias de aminoácidos de la región variable y el isotipo de los

anticuerpos 28F3, 19D3, 18E10, 3C3 (3C3-1 y 3C3-2), 2G6, 8A6, 9G7 (9G7-1 y 9G7-2), 14E3, 19H8 (19H8-1 y 19H8-2) y 6G10 se describen en las Figuras 2-31. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de las cadenas livianas y pesadas de cada anticuerpo se proporcionan en la Tabla 11. Las cadenas pesadas y livianas de 28F3 comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 15 y 16. Las cadenas pesadas y livianas de 19D3 comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 28 y 29. Las cadenas pesadas y livianas de 18E10 comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 41 y 42. Las cadenas pesadas y livianas de 3C3 comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 55 y 56. Las cadenas pesadas y livianas de 2G6 comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 73 y 74. Las cadenas pesadas y livianas de 8A6 comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 86 y 87. Las cadenas pesadas y livianas de 9G7 comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 100 y 101. Las cadenas pesadas y livianas de 14E3 comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 117 y 118. Las cadenas pesadas y livianas de 19H8-1 comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 131 y 132. Las cadenas pesadas y livianas de 19H8-2 comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 131 y 133. Las cadenas pesadas y livianas de 6G10 comprenden las secuencias de aminoácidos 337 y 338. Las secuencias de nucleótidos que codifican estas proteínas se proporcionan en la Tabla 11.

*Ejemplo 2: Fijación de anticuerpos anti-GITR a linfocitos T humanos y de *Macaca fascicularis* activados*

Los anticuerpos monoclonales humanos anti-GITR que se generaron en el Ejemplo 1 se evaluaron para determinar la fijación a linfocitos T humanos y de *Macaca fascicularis* activados que expresan GITR en sus superficies.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de ser humano o *Macaca fascicularis* se activaron con anticuerpo anti-CD3 recubierto en placa (Clon: UCHT1 para la activación de linfocitos T humanos; Clon: SP34 para la activación de linfocitos T de *Macaca fascicularis*; ambos de BD Biosciences) y anticuerpo anti-CD28 soluble (Clon: CD28.2 para ser humano y *Macaca fascicularis*, BD Biosciences) durante 4 días (humano) o 5 días (*Macaca fascicularis*). Las células se evaluaron para determinar la fijación a mAb GITR en un ensayo basado en la separación de células activadas por fluorescencia (FACS) usando un anticuerpo IgG antihumana conjugado con ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch). Las muestras

se analizaron en un citómetro de flujo BD FACS Canto.

Los anticuerpos anti-GITR 3C3, 19D3, 18E10 y 28F3 se fijaron tanto a linfocitos T humanos como de *Macaca fascicularis*. Como se muestra en la Figura 32, los anticuerpos 3C3, 19D3, 18E10 y 28F3 se fijaron firmemente a linfocitos T humanos activados, como se refleja en los valores EC50 de 0,04916 nM, 0,3633 nM, 0,1461 nM y 0,1916 nM, respectivamente. De manera similar, los anticuerpos 18E10 y 28F3 se fijaron a linfocitos T de *Macaca fascicularis* activados, con valores EC50 para 18E10 y 28F3 de 0,9134 nM y 1,044 nM, respectivamente (Figura 33). 3C3 no se fijó de manera considerable a linfocitos T de *Macaca fascicularis*.

Ejemplo 3: Fijación de anticuerpos anti-GITR a GITR soluble

La fijación de anticuerpos anti-GITR a GITR soluble se determinó mediante Biacore. Los anticuerpos anti-GITR se capturaron en chips recubiertos de kappa humano (~5KRUs; Southernbiotech cat#2060-01) y GITR humano recombinante (rHGITR/Fc: R&D systems, CAT#689-GR) se hizo fluir a través del chip en concentraciones de 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62 nM y 31 nM. La concentración de captura del mAb/volumen fue de 2-40 µg/ml (5 µl a 10 µl/min). El tiempo de asociación del antígeno fue de 5 minutos a 15 µl/min, el tiempo de disociación del antígeno fue de 6 minutos, y la regeneración se realizó con 50 mM de HCl/50 mM de NaOH (12 µl cada uno a 100 µl/min). Los resultados obtenidos con 28F3 y varios otros anticuerpos anti-GITR se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Kon (ka), Koff (kd) y KD de anticuerpos antiGITR

GITR-mab	Antígeno GITR humano (captura anti-Kappa del anticuerpo)		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
2G6	1.23E+05	1.47E-03	1.20E-08
3C3 subclón 1	4.14E+05	5.52E-03	1.33E-08
18E10	1.82E+05	2.41E-03	1.33E-08
3C3 subclón 2	4.30E+05	6.20E-03	1.44E-08
28F3	3.97E+05	5.89E-03	1.48E-08
19D3	2.76E+05	4.50E-03	1.63E-08
9G7	2.14E+05	7.48E-03	3.50E-08
6G10	3.83E+05	7.15E-04	1.87E-09

Los resultados indican que los anticuerpos anti-GITR se fijan a GITR soluble con una KD que varía de $1,2 \cdot 10^{-8}$ a $3,5 \cdot 10^{-8}$ M. Se proporcionan datos para 2 subclones de 3C3, con una KD que varía de $1,33 \cdot 10^{-8}$ a $1,44 \cdot 10^{-8}$ M.

En un experimento en Biacore separado, se determinaron las características de

fijación de los anticuerpos que tienen regiones variables de 28F3 con tres regiones constantes diferentes. El primer anticuerpo 28F3 tiene una región constante de IgG1 de tipo silvestre (“g1f”, también denominada “g1” o “IgG1” o “IgG1f”; en donde la cadena pesada tiene SEQ ID NO: 17 y la cadena liviana tiene SEQ ID NO: 19). El sufijo “f” se refiere al alotipo. El segundo anticuerpo tiene una región constante de IgG1 no efectora con tres mutaciones en la región Fc (“g1.1f”, también denominada “g1.1”, “IgG1.1” y “IgG1.1f”, que tiene L234A, L235E, G237A; en donde la cadena pesada tiene SEQ ID NO: 18 y la cadena liviana tiene SEQ ID NO: 19); y el tercer anticuerpo 28F3 tiene una región constante de IgG1 que tiene una mutación N297A.

El experimento Biacore se realizó como se describió anteriormente, excepto que los chips se recubrieron con anti-CH1 (Invitrogen Ref# 054500). Los resultados, que se muestran en la Tabla 6, indican que los tres anticuerpos tienen características de fijación similares, con una K_D que varía de $3,93 \times 10^{-8}$ M a $4,39 \times 10^{-8}$ M.

Tabla 6: Características cinéticas de 28F3 con varios Fc

Muestra	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Concentración funcional
28F3-g1f	8.85E+4	3.88 E-3	4.39 E-8	100%
28F3-IgG1.1	9.09 E+4	3.58 E-3	3.93 E-8	100%
28F3-N297A	7.88 E+4	3.36 E-3	4.26 E-8	100%

Ejemplo 4: Afinidad de fijación de anticuerpos anti-GITR a linfocitos T humanos activados y células 3A9-huGITR

La fijación de anticuerpos anti-GITR a GITR en linfocitos T humanos activados y línea celular hibridoma 3A9 de linfocitos T de ratón que expresan ectópicamente GITR humano (3A9-hGITR) se determinó mediante análisis de Scatchard. Este ensayo se realizó con 28F3.IgG1.1 (SEQ ID NO: 18 como cadena pesada y SEQ ID NO: 19 como cadena liviana) a 4,59 mg/ml.

El análisis de Scatchard en linfocitos T humanos activados se realizó como se describe a continuación. Los linfocitos T obtenidos de un donante humano se lavaron una vez con medio de cultivo (RPMI con 10 % de FBS, 2 mM de L-glutamina, piruvato de sodio, 2-mercaptoetanol) y se volvieron a suspender en el mismo medio de cultivo enriquecido con 1 µg/ml de anti-CD28 (CD28.2, BD#555725) y 100U/ml de IL-2 (Peprotech#200-02) a 10^6 células/ml. Se colocaron 5×10^6 células en forma individual en tres cavidades de una placa de 6 cavidades que se recubrió con 20 µg de anti-CD3 (5 ml, 4 µg/ml, durante la noche a 4 °C; UCHT-1, BD#555329). Las células se incubaron durante 3 días a 37 °C, y la mitad de esas células se usó para el análisis de

Scatchard (análisis del “día 3”). El medio vacío de la otra mitad se reemplazó con 5 ml de medio nuevo, las células se incubaron durante un día más y luego se usaron para un análisis de Scatchard (análisis del “día 4”) con estas células.

Para el análisis de Scatchard, 28F3.IgG1.1 se radioiodinizó con ^{125}I -Na (Perkin Elmer # NEZ033H001MC (1mCi) usando el reactivo de iodización de fase sólida IODO-GEN® (1,3,4,6-tetracloro-3a-6a-difenilglicourilo; Pierce #28601). El exceso de yoduro se retiró usando una columna de desalado (Pierce #43243). Las fracciones de anticuerpo etiquetado se recolectaron y se analizaron para determinar su radiactividad en un contador gama Wizard 1470 (Perkin-Elmer). Se calculó la concentración de ^{125}I -28F3.IgG1.1 en cada fracción con el fluorómetro Qubit™ de Invitrogen. La radiopureza se estableció mediante cromatografía de capa delgada de la proteína pico y las fracciones radiactivas (Pinestar Technology #151-005).

La fijación de 28F3.IgG1.1 radioiodinado a linfocitos T humanos activados se demostró mediante la incubación de los linfocitos T humanos activados con una titulación de ^{125}I -28F3.IgG1.1. La fijación no específica se determinó mediante la fijación en presencia de una titulación de un exceso molar de anticuerpo no etiquetado de 100 veces y se sustrajo del CPM total para calcular la fijación específica. Se usó una curva estándar lineal de la concentración de ^{125}I -28F3.IgG1.1 con respecto a CPM para extrapolar nM máximo de ^{125}I -28F3.IgG1.1 unido y, así, calcular la cantidad de receptores por célula. La cantidad de moléculas GITR humanas por linfocito T CD4+ humano estimulado en el día 3 fue de alrededor de 8400 y, en el día 4, de alrededor de 13.200. Los resultados del análisis de Scatchard indican que 28F3.IgG1.1 se fija en forma específica a linfocitos T CD4+ humanos estimulados durante 3 días con una K_D de 0,7 nM y a linfocitos T CD4+ humanos estimulados durante 4 días con una K_D de 0,87 nM.

La fijación de 28F3.IgG1.1 radioiodinado a células 3A9-huGITR se demostró mediante la incubación de las células 3A9-huGITR con una titulación de ^{125}I -28F3.IgG1.1. La fijación no específica se determinó mediante la fijación en presencia de una titulación de un exceso molar de anticuerpo no etiquetado de 100 veces y se sustrajo del CPM total para calcular la fijación específica. Se usó una curva estándar lineal de la concentración de ^{125}I -28F3.IgG1.1 con respecto a CPM para extrapolar nM máximo de ^{125}I -28F3 IgG1.1 unido y, así, calcular la cantidad de receptores por célula. La cantidad de moléculas GITR humanas por célula 3A9-huGITR fue de alrededor de 180.000. Los resultados del análisis de Scatchard indican que 28F3.IgG1.1 se fija en forma específica a células 3A9-huGITR con una K_D de 0,5 nM.

En otro experimento, se determinó la fijación de 28F3.IgG1 y 28F3.IgG1.1 a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ activados de donantes humanos y de *Macaca fascicularis*. Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ humanos y de *Macaca fascicularis* se aislaron de donantes humanos y de *Macaca fascicularis* y se trataron con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 para activarlos. Los resultados indican que 28F3.IgG1 y 28.IgG1.1 se fijan en forma similar a linfocitos CD4⁺ humanos activados, con valores EC50 de 0,55 nM y 0,67 nM, respectivamente, y en forma similar a linfocitos CD8⁺ humanos activados, con valores EC50 de 0,56 nM y 0,65 nM, respectivamente. 28F3.IgG1 y 28.IgG1.1 se fijan a linfocitos CD4⁺ de *Macaca fascicularis* activados, con valores EC50 de 1 nM y 0,86 nM, respectivamente, y en forma similar a linfocitos CD8⁺ de *Macaca fascicularis* activados, con valores EC50 de 1,26 nM y 0,74 nM, respectivamente.

Ejemplo 5: Los anticuerpos monoclonales anti-GITR humanos inhiben la fijación de GITR-L a GITR

Para determinar si los anticuerpos anti-GITR de HuMab inhiben la fijación del ligando GITR a GITR, la línea celular hibridoma 3A9 de linfocitos T de ratón que expresa ectópicamente GITR humano (células GITR-3A9) se incubó previamente con mAbs GITR en concentraciones que varían de 10⁻⁴ µg/ml a 100 µg/ml, luego se incubó el ligando GITR (R&D Systems#6987-GL) en una concentración de 10 ng/ml. La fijación del ligando GITR a células se determinó en un ensayo basado en FACS usando un anticuerpo anti-hemaglutinina (HA) etiquetado conjugado con PE, y las muestras se analizaron en un citómetro de flujo BD FACS Canto. Como se muestra en las Figuras 34A y 34B, dadas estas condiciones, los anticuerpos 19D3, 28F3 y GITR.3 (3C3) bloquearon la fijación de GITR-L a células GITR-3A9, con valores EC50 de 0,7546, 0,2783 y 0,06934, respectivamente. Se obtuvieron resultados similares con el anticuerpo 19H8.

Se realizaron otros experimentos en diferentes condiciones para evaluar hasta qué grado los anticuerpos anti-GITR bloquean la fijación de GITR-L a GITR. En estos experimentos, se agregó un trímero hGITR-L recombinante en concentraciones de 1,06 x 10⁻⁹ a 100 mg/ml a linfocitos T humanos activados y se fijó de manera dependiente de la dosis a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ T con valores EC50 de 0,016 ug/ml (Figura 34C). El experimento se llevó a cabo de la siguiente manera: Se agregó el trímero hGITR-L recombinante (R&D Systems Cat. 6987-GL) en una concentración de 1.06e-9 a 100 µg/ml a linfocitos T activados con PHA. Después de una incubación primaria de 30 minutos, se detectó GITR-L unido a la célula usando una etiqueta de

anti-HA conjugado con PE (Miltenyi Cat. 120-002-687). Las muestras se obtuvieron en un citómetro de flujo FACS Canto (BD, San Jose) y se analizaron con el software FlowJo (Tree Star, Inc, Ashland, OR).

La prefijación de rhGITR-L en concentraciones de $1,06 \times 10^{-9}$ a 100 ug/ml en linfocitos T activados bloqueó la fijación posterior de 0,5 ug/ml de 28F3-hlgG1 (aproximadamente, 90 % de saturación) con un IC50 de 0,0024 ug/ml. Como en 100 ug/ml la MFI no llegó a la base de referencia (el control IgG), la inhibición fue parcial (Figura 34D). El experimento se llevó a cabo de la siguiente manera: Primero, los linfocitos T activados con PHA se trataron con una titulación triple de 24 puntos del trímero GITR-L recombinante (R&D Systems 6987-GL), a partir de 100 μ g/ml, durante 30 minutos. Luego se agregó 28F3-hlgG1 en una concentración fija de 0,5 μ g/ml a la mezcla de células, la cual se sometió a 30 minutos adicionales de incubación. El 28F3-hlgG1 unido a la célula se detectó usando un anticuerpo secundario conjugado con PE contra Fc de IgG humana (Jackson ImmunoResearch Cat. 109-116-098). Se usó un Ab hlgG1 no relacionado como control de isotipo de 28F3-hlgG1 y se incluyó una muestra sin incubación previa de GITR-L para mostrar la fijación de 28F3-hlgG1 en ausencia de bloqueo. Las muestras se obtuvieron en un citómetro de flujo FACS Canto (BD, San Jose) y se analizaron con el software FlowJo (Tree Star, Inc, Ashland, OR).

Cuando los linfocitos T activados se incubaron previamente con 28F3-hlgG1 en concentraciones que variaban de $1,06 \times 10^{-9}$ a 100 ug/ml, la fijación de GITR-L a 0,6 ug/ml (aproximadamente 90 % de saturación) no resultó afectada (Figura 34E). Sin embargo, cuando se agregó GITR-L en una concentración menor de 20 ng/ml, cerca de su EC50, el 28F3-hlgG1 unido previamente bloqueó parcialmente la fijación, con un IC50 de 0,076 ng/ml (Figura 34F). Los experimentos se llevaron a cabo de la siguiente manera: Los linfocitos T activados con PHA se incubaron previamente con 28F3-hlgG1 en concentraciones en el rango de 0,00056 a 100 μ g/ml, luego se agregaron 0,6 ug/ml o 20 ng/ml de GITR-L. El GITR-L unido a la célula se detectó con una etiqueta de anti-HA conjugado con PE. Se incluyó una hlgG1 no relacionada como control de isotipo de 28F3-hlgG1 y se usó una muestra sin anticuerpo primario para mostrar la fijación de GITR-L sin bloqueo. Las muestras se obtuvieron en un citómetro de flujo FACS Canto (BD, San Jose) y se analizaron con el software FlowJo (Tree Star, Inc, Ashland, OR).

Estos datos muestran que 28F3-hlgG1 es un bloqueador de ligando parcial que puede permitir, en parte, el acoplamiento *in vivo* de GITR y GITR-L.

Ejemplo 6: Todos los anticuerpos anti-GITR se agrupan en un grupo

Los experimentos de agrupación de anticuerpos se llevaron a cabo con los siguientes anticuerpos antihumanos GITR: 28F3, 18E10, 19D3, 14E3, 8A6, 9G7, 3C3 y 6G10.

Los anticuerpos anti-GITR se inmovilizaron en las superficies de chips Sensor Chip CM5 (Series S, GE Healthcare CAT# BR-1005-30) flowcell2, flowcell3 y flowcell4 (5000 RUs), y flowcell1 se usó como control negativo. Los anticuerpos se diluyeron a 120 µg/ml (2X) en concentración de inicio. Se realizaron una serie de diluciones diluyendo una concentración 1:3 de anticuerpo con amortiguador durante ocho concentraciones diferentes (120 µg/ml-0.0 µg/ml, 2X) para obtener una curva de titulación. Cada serie de concentración de los anticuerpos se dividió en dos mitades. En la primera mitad de las series de concentración, se agregaron 40 nM (2X) de antígeno GITR (rHGITR/Fc CAT# 689-GR) para realizar la serie de concentración final (60 µg/ml-0.0 µg/ml) y 20 nM de concentración final de antígeno en cada cavidad. En la segunda mitad de las series de concentración, en lugar del antígeno, se agregó amortiguador para diluir el anticuerpo en la misma concentración, y esta mitad se trató como blanco. Los complejos se incubaron durante 2 horas. Se inyectaron 40 µl de complejos en la superficie recubierta de anticuerpo a una velocidad de flujo de 30 µl/min. Se usó un instrumento Biacore T200, y, como amortiguador de corrida, se usó HBE-EP, GE Healthcare CAT# BR-1001-88, filtrado desgasificado, HEPES 0,01M, pH7,4, 0,15 de NaCl, 3Mm de EDTA, 0,005 % de tensioactivo P20. La superficie se regeneró con 25 mM de NaOH (Código de pedido: BR-1003-58, GE Healthcare) a 100 µl/min durante 5 segundos. Los datos se analizaron usando Microsoft Excel, en donde las series de concentración de anticuerpos se representaron gráficamente contra la unidad de respuesta correspondiente para obtener curvas de titulación.

Los resultados indican que todos los anticuerpos evaluados se agrupan en un grupo, lo cual indica que todos se fijan a una región similar de la región extracelular de GITR humano.

Ejemplo 7: Los anticuerpos anti-GITR se fijan a un epítipo conformacional

Este ejemplo muestra que los anticuerpos anti-GITR 28F3 y 3C3 se fijan a GITR humano no desnaturalizado, pero no a GITR humano desnaturalizado, y la fijación no está afectada por la glucosilación ligada a O o N.

La fijación de los anticuerpos anti-GITR a GITR nativo o desnaturalizado que tiene o no glucosilación ligada a N se determinó como se explica a continuación. Las

muestras de GITR humano nativo (es decir, no desnaturalizado) y desnaturalizado se incubaron con o sin la enzima N-glucanasa PNGase F a 37 °C en PBS durante la noche para retirar la glucosilación N. La desnaturalización de GITR se realizó mediante la reducción a 37 °C en 50 mM de ditioneol y 4 M de clorhidrato de guanidina durante 45 minutos y, luego, se realizó la alquilación en 100 mM de yodoacetamida durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las pruebas de GITR humano nativo con o sin glucosilación ligada a N se sometieron a electroforesis SDS en gel, y las muestras de GITR desnaturalizado con o sin glucosilación ligada a N se sometieron a electroforesis SDS en gel desnaturalizante. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa para realizar el análisis de transferencia Western. La membrana se incubó con el anticuerpo 28F3. La fijación se detectó mediante incubación con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (etiquetado HRP) específico de las cadenas pesadas y livianas de IgG antihumana (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), y luego se realizó la detección de la luminiscencia capturada en video. Los resultados, los cuales se muestran en la Figura 35, indican que el Ab anti-GITR 28F3 se fija solo a GITR nativo y no a la forma desnaturalizada, y que la presencia o ausencia de la glucosilación no afecta la fijación. Se obtuvieron resultados similares con el anticuerpo anti-GITR 3C3.

Por lo tanto, los anticuerpos anti-GITR 28F3 y 3C3 se fijan a un epítipo que es conformacional e independiente de la glucosilación ligada a N o ligada a O.

Ejemplo 8: Patrones de fijación de 28F3 y 3C3 a péptidos GITR humano nativo

Se investigó el patrón de fijación de 28F3 y 3C3 a GITR humano mediante la evaluación de la fijación de estos anticuerpos a péptidos generados a partir de GITR humano nativo mediante SDS-PAGE y análisis de transferencia Western. El experimento se llevó a cabo de la siguiente manera. Primero, GITR humano nativo se sometió a proteólisis mediante la incubación con endoproteinasa Arg-C, endoproteinasa Lys-C, tripsina, endoproteinasa Glu-C o endoproteinasa Asp-N en una proporción p/p de 2 % a 37 °C en PBS durante 5 horas sin la presencia de reactivos de desnaturalización. La mezcla de reacción entera, 2 µg de cada digestión, se sometió a electroforesis SDS-PAGE no desnaturalizante y se transfirió a nitrocelulosa para realizar el análisis de transferencia Western. Luego, las transferencias Western se incubaron con anticuerpo 28F3 o 3C3, y la fijación se detectó mediante incubación con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (etiquetada HRP) específico de las cadenas pesadas y livianas de IgG antihumana (Jackson

ImmunoResearch Laboratories, Inc.), y luego se realizó la detección de la luminiscencia capturada en video. Los resultados, que se muestran en la Figura 36, indican que el patrón de fijación de 28F3 y 3C3 es diferente, lo cual sugiere que esos anticuerpos no se fijan exactamente a la misma región de GITR humano.

Ejemplo 9: El anticuerpo anti-GITR 28F3 se fija a los terminales N del dominio extracelular de GITR humano

La ubicación de la región en GITR humano a la que se fija 28F3 se determinó evaluando la fijación en solución del anticuerpo a diversos fragmentos no desnaturalizados de GITR humano. El experimento se llevó a cabo de la siguiente manera: Los fragmentos de péptido GITR humano se generaron mediante la incubación de GITR humano con endoproteinasa Arg-C, endoproteinasa Lys-C, tripsina, endoproteinasa Glu-C o endoproteinasa Asp-N en una proporción p/p de 2 % a 37 °C en PBS durante 5 horas sin la presencia de reactivos de desnaturalización. Luego, la mezcla de péptidos se incubó con microesferas de Ab anti-GITR en PBS a temperatura ambiente durante 2 horas. Algunas muestras se sometieron a escisión secundaria *in situ* mediante incubación con una enzima diferente en PBS durante una hora. Los péptidos no unidos se retiraron lavando las microesferas de Ab anti-GITR dos veces con PBS. Los péptidos que se fijaron al Ab anti-GITR 28F3 se eluyeron con ácido fórmico al 2 % y luego se sometieron a identificación de secuencias mediante LC-MS. Los resultados, que se muestran como un mapa de calor en la Figura 37, indican que 28F3 se fija a un epítipo conformacional dentro de la siguiente porción de aminoácidos del terminal N:

QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGE (SEQ ID NO: 215), que corresponde a los residuos de aminoácidos 1 a 39 de GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4) o dentro del fragmento más corto QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTR (SEQ ID NO: 370).

Ejemplo 10: La glucosilación ligada a O en GITR humano no interfiere en la fijación de 28F3

No existe glucosilación ligada a O en el dominio extracelular de GITR humano conocida o documentada. Sin embargo, los residuos de T18 y T20 de SEQ ID NO: 215 contienen una secuencia de consenso de glucosilación O. Estos residuos se subrayan en la secuencia de epítipo:

QRPTGGPGCGPGRLLLGTDARCCRVHTTRCCRDYPGE (SEQ ID NO: 215). Por

lo tanto, se determinó si la glucosilación ligada a O afecta la fijación de 28F3 a GTR humano.

La fijación de 28F3 a un péptido glucosilado o no glucosilado, que consiste en SEQ ID NO: 215, se realizó de la siguiente manera: Los péptidos del terminal N de GTR humano parcialmente glucosilados o no glucosilados se generaron mediante proteólisis del dominio extracelular de GTR humano nativo intacto ligado a Fc de ratón. El péptido GTR no glucosilado que consiste en los residuos de aminoácidos 1 a 39 de SEQ ID NO: 215 también se generó mediante síntesis orgánica. Los procedimientos para fijar 28F3 a los péptidos se describieron en la sección anterior (usando microesferas recubiertas con 28F3). Como se muestra en la Figura 38B, se descubrió que dos péptidos se fijan a las microesferas recubiertas con 28F3, y se identificó mediante LC-MS que uno de estos es el péptido del terminal N sin glucosilación ligada a O (Figura 38A) y el otro es el mismo péptido del terminal N con glucosilación ligada a O en T18 y/o T20 de SEQ ID NO: 215 (Figura 38D).

Por lo tanto, 28F3 se fija a la región del terminal N del GTR humano sin importar si tiene un azúcar ligado a O en el aminoácido T18 y/o T20.

Ejemplo 11: Fijación del anticuerpo anti-GTR 28F3 a 20-mer

Como parte del experimento descrito en el Ejemplo previo, primero se fijó un péptido sintético que tiene SEQ ID NO: 215 que no tiene glucosilación ligada a O, a las microesferas recubiertas con 28F3, y luego se escindió mediante digestión *in situ* con endoproteinasa Asp-N. El péptido restante, que consiste en la secuencia de aminoácidos QRPTGGPGCGPGRLLLLGIGI (SEQ ID NO: 216) y que contiene los residuos de aminoácidos T18 y T20 sin glucosilación ligada a O, se fijó a 28F3 (Figura 38E). Por lo tanto, 28F3 se fija a 20-mer, que consiste en SEQ ID NO: 216.

Ejemplo 12: Mapeo del epítipo mediante HDX-MS

El método de espectrometría de masa de intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX-MS) estudia la conformación proteica en sondas y la dinámica conformacional en solución mediante el control de la velocidad y el alcance del intercambio de deuterio de los átomos de hidrógeno de la amida de la estructura principal. El nivel de HDX depende de la accesibilidad del solvente de los átomos de hidrógeno de la amida de la estructura principal y los puentes de hidrógeno de las proteínas. El aumento másico de la proteína en HDX se puede medir con precisión mediante MS. Cuando esta técnica se usa junto con la digestión enzimática, se pueden resolver las características

estructurales en cuanto al péptido, lo que permite diferenciar los péptidos expuestos a la superficie de los plegados hacia adentro. Con frecuencia, se realiza el etiquetado con deuterio y los experimentos de inactivación posteriores, y luego la digestión de pepsina en línea, la separación de los péptidos y el análisis MS.

Antes del mapeo del epítipo de mAb 28F3.IgG1 (que tiene una cadena pesada y una cadena liviana que consiste en SEQ ID N.^{os}: 17 y 19, respectivamente) en GITR mediante HDX-MS, se realizaron experimentos no deuterados para generar una lista de péptidos pépticos habituales para GITR/Fc recombinante humano (R&D systems, 10 μ M, que contiene la sustitución de aminoácidos T20A) y el complejo proteico de GITR/Fc recombinante humano y mAb 28F3.IgG1 (1:2 de relación molar, 10 μ M & 20 μ M), lo cual logra una cobertura de secuencia de 86 % para la región del terminal N de GITR (Figura 39A). En este experimento, se usaron 10 mM de amortiguador de fosfato (pH 7,0) durante la etapa de etiquetado, y luego se agregó un amortiguador de inactivación (200 mM de amortiguador de fosfato con GdnCl 4 M y TCEP 0,5 M, pH 2,5, 1:1, v/v). Para los experimentos de mapeo de epítipos, se diluyeron 5 μ l de cada muestra (GITR/Fc o GITR/Fc con mAb 28F3.IgG1 (1:2 de relación molar)) en 55 μ l de amortiguador de D₂O (10 mM de amortiguador de fosfato, D₂O, pD 7,0) para iniciar las reacciones de etiquetado a temperatura ambiente. Las reacciones se llevaron a cabo durante diferentes períodos: 20 s, 1 min, 10 min, 60 min y 240 min. Al final de cada período de reacción de etiquetado, la reacción se inactivó mediante la adición de amortiguador de inactivación (1:1, v/v), y 50 μ l de la muestra inactivada se inyectó en el sistema Waters HDX-MS para su análisis. Los péptidos pépticos comunes observados se controlaron para determinar sus niveles de absorción de deuterio en ausencia/presencia de mAb 28F3.IgG1.

Los datos experimentales que se muestran en las Figuras 39B y 39C obtenidos de las mediciones mediante HDX-MS de mAb 28F3.IgG1 en GITR indican que mAb 28F3.IgG1 tiene un epítipo discontinuo que está compuesto por dos regiones de péptidos en la región del terminal N de GITR o se encuentra dentro de estas:

Región de péptidos 1: PTGGPGCGPGRLLLGTGA (SEQ ID NO: 217)

Región de péptidos 2: CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218)

En función de los cambios en los niveles relativos de absorción de deuterio, las dos regiones de péptidos se pueden clasificar como las regiones 1 > 2, de las cuales la región 1 tiene los cambios más significativos en la absorción de deuterio y la región 2 es estadísticamente significativa.

Ejemplo 13: Los anticuerpos anti-GITR inducen la secreción de IL-2 y IFN- γ de linfocitos T

Los anticuerpos anti-GITR se evaluaron para determinar su capacidad para mejorar la actividad de linfocitos T *in vitro* midiendo la cantidad de IL-2 y IFN- γ segregada de linfocitos T incubados con los anticuerpos.

La línea celular hibridoma 3A9 de linfocitos T de ratón, que expresa ectópicamente GITR humano (3A9-hGITR), se cultivó en placas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-CD3 en presencia de cantidades en aumento de anticuerpos 19D3, 18E10, y 28F3. Se cultivaron 5×10^4 células 3A9-hGITR en placas recubiertas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-CD3 (Clon 145-2C11; BD Biosciences) y se trataron con las concentraciones indicadas de anticuerpos durante 24 horas. Como se muestra en la Figura 40, los anticuerpos 3C3 (GITR.3), 28F3, 19D3 y 18E10 mejoraron la secreción de IL-2 de linfocitos T de manera dependiente de la dosis. Como se esperaba, los anticuerpos de control hIgG1 y hIgG2 no aumentaron la secreción de IL-2 de células 3A9-hGITR.

Dado que los anticuerpos anti-GITR mejoraron la secreción de IL-2 de células 3A9-hGITR en presencia de una señal de CD3 estimuladora, se evaluó la capacidad de los anticuerpos de mejorar la secreción de IL-2 de células 3A9-hGITR activadas por un antígeno específico. Se cocultivaron 5×10^4 células 3A9-hGITR con $2,5 \times 10^4$ células LK35.2 que presentan antígenos, en presencia de 0,4 μM de péptido HEL48-63 y los anticuerpos indicados durante 24 horas. Como se muestra en las Figuras 41A y 41B, los anticuerpos 18E10, 13H2 (mismo anticuerpo que 28F3), 28F3, 3C3 y 19D3 mejoraron la secreción de IL-2 de células 3A9-hGITR de manera dependiente de la dosis.

En otros experimentos, el efecto de 28F3 sobre la secreción de IL-2 y IFN- γ de linfocitos T se evaluó en linfocitos T de donante humano que se estimularon con células CHO que expresan anti-CD3scFv (OKT3). Las células CHO expresaron niveles bajos de OKT3 para promover una estimulación subóptima, a fin de poder observar agonismo por parte de los anticuerpos anti-GITR. En un conjunto de experimentos, los linfocitos T CD3⁺ de un donante se estimularon con células CHO que expresan OKT3 y un anticuerpo anti-GITR, y se midió la secreción de IFN- γ , y en otro conjunto de experimentos, los linfocitos T CD4⁺ de dos donantes (diferentes del donante de los linfocitos T CD3⁺) se estimularon con células CHO que expresan OKT3 y un anticuerpo anti-GITR, y se midió la secreción de IL-2 y IFN- γ . Los experimentos se llevaron a cabo de la siguiente manera. Los linfocitos T Pan se obtuvieron de PBMC

humanas aisladas mediante gradiente Ficoll (Amersham Bioscience 17-1440-03) con kit de aislamiento de linfocitos T Pan (Miltenyi#130-091-156) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para los experimentos con linfocitos T CD4+, los linfocitos T CD4+ se obtuvieron de PBMC humanas (donantes 1 y 2) con cóctel de enriquecimiento de linfocitos T CD4+ humanos RosetteSep (StemCell Technology#15062) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células CHO que expresan anti-CD3scFv (OKT3) (CHO-OKT3) se lavaron dos veces con medio RPMI y se sometieron a irradiación con una dosis de 50K Rad. Las células se recolectaron y se volvieron a suspender en medio de cultivo (RPMI-1640 enriquecido con 10 % de suero bovino fetal, 2mM de L-glutamina, 55nM de β -mercaptoetanol, 1mM de piruvato de sodio y 100U/ml de penicilina/estreptomicina) a $2,5 \times 10^5$ /ml. Se sembraron $2,5 \times 10^4$ células CHO-OKT3 y 1×10^5 linfocitos T en cavidades de una placa de cultivo tisular de fondo plano de 96 cavidades (Costar). Las células se incubaron con una titulación triple de 8 puntos de anticuerpo GITR a partir de 20 μ g/ml. Se agregó hIgG1 no relacionada a 20 μ g/ml como control de isotipo. Se incluyó una muestra con células solo para mostrar actividad de referencia sin tratamiento. El sobrenadante de cada muestra se recolectó el día 2 para la medición de IL-2 (solo para ensayos con linfocitos T CD4+) (kit ELISA para IL-2 humana BD optEIA; BD Bioscience#555190) y el día 3 para la medición de IFN- γ (kit ELISA para IFN- γ humano BD optEIA; BD Bioscience#555142).

Los resultados, que se muestran en la Figura 42B-E, indican un aumento dependiente de la dosis de 28F3 en la secreción de IL-2 e IFN- γ por parte de linfocitos T CD4+ de ambos donantes.

También se demostró la secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T de donante estimulados con otros anticuerpos anti-GITR anticuerpos. El ensayo se llevó a cabo como se describió anteriormente. Como se muestra en la Figura 42A, los anticuerpos 28F3, 3C3, 19D3 y 18E10 mejoraron la secreción de IFN- γ en linfocitos T CD3+ de manera dependiente de la dosis, y los anticuerpos 28F3 y 3C3 muestran el efecto más significativo de los anticuerpos evaluados.

En otro experimento, la proliferación de linfocitos T en presencia de anticuerpos anti-GITR, en particular, 28F3, se observó en reacciones de linfocitos mezclados (MLR).

En forma conjunta, estos datos indican que los anticuerpos 18E10, 19D3 y 28F3 funcionan como anticuerpos anti-GITR agonistas que mejoran la secreción de citocinas de linfocitos T.

Ejemplo 14: Los anticuerpos anti-GITR activan las respuestas de linfocitos T de manera independiente de la interacción de FcR in vitro

Se informó que los anticuerpos anti-TNFR agonistas requieren de coacoplamiento a FcγRIIB para su actividad *in vivo* (Li et al., *Cell Cycle* 2012;11:3343-3344). Para determinar si esta necesidad también se extiende a anticuerpos anti-GITR, las células 3A9-hGITR se cocultivaron con células LK35.2 y el péptido HEL48-63 como se describió en el Ejemplo 13, se trataron con el anticuerpo anti-GITR de longitud completa 28F3 (hIgG2), el fragmento F(ab')₂ de 28F3 o el fragmento Fab de 28F3, y se evaluó para determinar la producción de mIL-2. Los resultados, que se establecen en la Figura 43, muestran que tanto el 28F3 de longitud completa como el fragmento F(ab')₂ de 28F3 mejoraron la producción de mIL-2, aunque el fragmento Fab de 28F3 tuvo un efecto más débil, lo cual sugiere que el acoplamiento bivalente, pero no monovalente, contribuye al efecto del anticuerpo anti-GITR 28F3. En forma conjunta, estos resultados sugieren que, aunque no se requiere el coacoplamiento de FcγRIIB para los efectos mejoradores de linfocitos T de los anticuerpos anti-GITR agonistas *in vitro*, acoplar el receptor de FcγRIIB puede potenciar la actividad agonista. Los anticuerpos anti-GITR se pueden modificar por ingeniería genética para aumentar la fijación al receptor de FcγRIIB para aumentar su agonismo.

Ejemplo 15: El anticuerpo anti-GITR 28F3 etiqueta linfocitos en amígdalas humanas

Para determinar qué tejidos expresan GITR, se usó el anticuerpo anti-GITR 28F3 para la detección inmunohistoquímica de GITR en diversos tejidos. No se encontró tinción específica en tejidos no linfáticos (que incluyen corazón, hígado, pulmón, riñón, piel, nervio periférico, tiroides, testículos, próstata). La tinción positiva solo se observó en subconjuntos dispersados de linfocitos y/o células mononucleares en tejidos linfáticos (que incluyen amígdalas, bazo y timo) y ricos en formaciones linfáticas (lámina propia de colon, estómago, útero). La tinción en amígdalas se muestra en la Figura 44. La tinción positiva se observó en linfocitos dispersados en la región inter/parafolicular y el centro germinal. Los cúmulos dispersados de células mononucleares (debajo del epitelio) y los linfocitos infiltrantes de epitelio también mostraron tinción positiva.

Ejemplo 16: Actividad antitumoral de variantes de isotipos anti-GITR en modelos de tumores MC38

DTA-1 es un anticuerpo GITR agonista anti-ratón de rata (Shimizu *et al.*, 2002; eBioscience, San Diego, CA). Se demostró que este anticuerpo IgG2b modula T_{reg} y T_{eff} durante el tratamiento de melanoma B16. Además, la expresión de GITR de T_{eff} y T_{reg} era necesaria para obtener los efectos completos de DTA-1. Cohen *et al.* (2010) sugirió que, aunque la ligadura de GITR por parte de DTA-1 no anula completamente la actividad supresora de T_{reg} , perjudica la infiltración de tumor de T_{reg} y provoca la pérdida de la expresión de Foxp3 dentro de los T_{reg} intratumorales, lo cual implica una anulación o supresión localizada. El resultado neto es una relación $T_{eff}:T_{reg}$ intratumoral aumentada y mayor activación y función de T_{eff} dentro del tumor. DTA-1 bloquea la interacción entre GITR y el ligando GITR (GITRL), y el anticuerpo soluble es eficaz para promover una respuesta celular *in vitro*. También es eficaz en diversos modelos de tumores para inhibir el crecimiento tumoral (véase, por ejemplo, Turk *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2010).

a) Experimento MC38 #1

La actividad antitumoral de los diferentes isotipos anti-GITR (DTA-1) se evaluó en un modelo de tumor MC38 de adenocarcinoma de colon en etapas. Se inyectaron en forma subcutánea 2×10^6 células tumorales MC38 en ratones C57BL/6. Luego de 7 días, los ratones se aleatorizaron en 5 grupos de tratamiento, y se administraron anticuerpos de prueba en forma IP los días 7, 10 y 14 a 200 μ g por dosis en un volumen de 200 μ l de la siguiente manera: Grupo 1: IgG1 de ratón de control (IgG); Grupo 2: Ab IgG2b de rata anti-GITR (DTA-rG2b); Grupo 3: Ab IgG1 de ratón anti-GITR (DTA-mG1); y Grupo 4: Ab IgG 2a de ratón anti-GITR (DTA-mG2a). Se recolectaron tumores y bazos el día 15.

La Figura 45C muestra que los tumores tratados con IgG1 anti-GITR crecieron a una velocidad comparable con la de los tumores tratados con IgG1 de ratón de control (Figura 45A), ninguno de los 10 ratones estaba libre de tumores (TF) para cuando finalizó el control de los ratones. Sin embargo, DTA-rG2b (Figura 45B) y DTA-mG2a (Figura 45D) redujeron significativamente la velocidad del crecimiento tumoral, y 3 y 2 de los 10 ratones, respectivamente, quedaron libres de tumores.

Los cambios en la media de los volúmenes tumorales y en la mediana de los volúmenes tumorales de los ratones de los grupos tratados con diferentes isotipos anti-GITR se representan gráficamente en las Figuras 46A y 46B. Estas representaciones confirman los datos de ratón individuales que se muestran en la Figura 45 que indican que el isotipo IgG2b del anticuerpo anti-GITR exhibe el efecto inhibitor más potente sobre el crecimiento de tumor MC38, y el isotipo IgG2a es

apenas menos potente. El isotipo IgG1 muestra poca inhibición del crecimiento tumoral, y la media y la mediana de los volúmenes tumorales son similares a aquellas de los ratones tratados con el IgG de ratón de control.

También se determinaron los efectos de los isotipos anti-GITR sobre subconjuntos de linfocitos T de MC38 en TIL y bazo. Se compararon las poblaciones de subconjuntos de linfocitos T en TIL y bazo con MC38 de ratones tratados con diferentes isotipos anti-GITR. En el bazo, DTA-m2a y DTA-r2b causaron una leve reducción en el nivel de linfocitos CD8⁺, mientras que 9D9-m2a (un anticuerpo anti-CTLA-4) y DTA-m1 no alteraron los niveles de linfocitos T CD8⁺ (Figura 47A). Ninguna de las variantes de isotipos evaluadas tuvo un efecto significativo en el porcentaje de linfocitos CD4⁺ o CD4⁺Foxp3⁺ en el bazo (Figuras 47B y 47C).

En TIL, 9D9-m2a causó al menos un aumento del doble en el porcentaje de linfocitos CD8⁺ en comparación con los dos IgG1 de ratón de control (Figura 47D). DTA-m2a tuvo un efecto menos pronunciado y aumentó el porcentaje de linfocitos CD8⁺ alrededor de 50 %, mientras que DTA-m1 y DTA-r2b no causaron ningún aumento, o solo causaron un aumento mínimo, en el porcentaje de linfocitos CD8⁺ en comparación con el control de isotipo IgG1 de ratón (Figura 47D). 9D9-m2a causó un pequeño aumento en el porcentaje de linfocitos CD4⁺ en comparación con el control de isotipo IgG1 de ratón, mientras que DTA-m1 no causó cambios en CD4⁺ (Figura 47E). Por el contrario, tanto DTA-m2a como DTA-r2b redujeron los porcentajes de CD4⁺ un 40-50 % en comparación con el isotipo IgG1 de ratón (Figura 47E).

Los efectos más drásticos se observaron en los niveles de T_{reg} CD4⁺Foxp3⁺ entre los TIL. Aunque DTA-m1 no tuvo efecto sobre esta población de linfocitos T, 9D9-m2a y DTA-m2a indujeron una reducción de aproximadamente 6 veces en el nivel de T_{reg} CD4⁺Foxp3⁺ en comparación con el isotipo IgG1 y DTA-m1 (Figura 47F). Estos datos demuestran que la variante IgG2a de anti-GITR reduce el nivel de T_{reg} específicamente en el entorno tumoral. Por lo tanto, el isotipo IgG2a anti-GITR induce un aumento de T_{eff} CD8⁺ y una disminución de T_{reg} en el sitio del tumor, lo cual crea una relación elevada de T_{eff} con respecto a T_{reg} que indica una fuerte actividad antitumoral. DTA-r2b también indujo una reducción significativa en el nivel de T_{reg} CD4⁺Foxp3⁺ en comparación con el IgG1 de control, aunque no sea una reducción tan pronunciada como la inducida por 9D9-m2a y DTA-m2a, que es consistente con la menor fijación de la región Fc de IgG2b de rata a FcγR activadores murinos. Estos datos demuestran que el anticuerpo anti-GITR agonista requiere el acoplamiento de FcγR activadores para la actividad reductora.

La medición citométrica de flujo del nivel de la expresión de GITR en diferentes subconjuntos de linfocitos T en TIL y bazo con MC38 mostró que GITR se estaba altamente expresado en T_{reg} en el sitio del tumor, el nivel de expresión es más alto que en T_{reg} en la periferia o $T_{eff} CD8^+$ en el sitio del tumor que, a su vez, exhibió un nivel de expresión más alto que $T_{eff} CD8^+$ o $CD4^+$ en la periferia. El nivel relativo más bajo de la expresión de GITR se observó en $T_{eff} CD4^+$ en el sitio del tumor. Estos datos sugieren un mecanismo por el que la actividad reductora de linfocitos T ayuda a la estimulación de una respuesta de linfocitos T y, así, mejora la eficacia antitumoral de una proteína de fusión Fc si la diana de la proteína de fusión Fc está altamente expresada en T_{reg} en el sitio del tumor, en relación con la expresión de la diana en T_{eff} en el sitio del tumor, y la proteína de fusión Fc se fija a un FcR activador que media la reducción de la célula diana.

b) Experimento MC38 #2

Debido a la agregabilidad que se encuentra en las variantes de DTA-1 (excepto, la forma original de DTA-r2b, obtenida en el comercio), se volvió a modificar por ingeniería genética un conjunto nuevo de variantes isotópicas para obtener anticuerpos DTA-1 sin agregabilidad. La agregabilidad observada se adjudicó a un aminoácido adicional que se había incorporado accidentalmente a la cadena liviana de las variantes isotópicas modificadas por ingeniería genética, y el problema se solucionó retirando el aminoácido externo. Los anticuerpos que se volvieron a modificar por ingeniería genética se usaron en este Experimento #2. La actividad antitumoral de isotipos anti-GITR modificados nuevamente por ingeniería genética (DTA-1; serie GITR.7) se evaluó usando un modelo MC38 en etapas. Se implantaron 2×10^6 células MC38 en forma subcutánea a ratones C57BL/6. Después de 7 días, los ratones se aleatorizaron en 7 grupos de tratamiento con el fin de tener una media de volúmenes tumorales comparable de alrededor de $148 \text{ mm}^3/2$, y se administraron anticuerpos de prueba en forma IP los días 7, 10 y 14 a 200 μg por dosis (excepto por el mIgG de control, que se administró en dosis de 200 μg) de la siguiente manera: Grupo 1: IgG1 de ratón de control (mIgG o “isotipo”); Grupo 2: IgG1Ab de ratón anti-GITR (mGITR.7.mg1); Grupo 3: isotipo IgG1D265A de ratón anti-GITR (mGITR.7.mg1-D265A); Grupo 4: Ab IgG2a de ratón anti-GITR (mGITR.7.mg2a); Grupo 5: Ab IgG2b de ratón anti-GITR (mGITR.7.mg2b); y Grupo 6: Ab IgG2b de rata anti-GITR (mGITR.7.r2b o DTA-1-rG2b). Se recolectaron tumores y bazos el día 15.

Las Figuras 48B y 48C muestran que los tumores tratados con IgG1 e IgG1-

D265A anti-GITR crecieron a una velocidad comparable con la de los tumores tratados con IgG1 de ratón de control (Figura 48A). En cada caso, ninguno de los 9 ratones quedó libre de tumores para el final del control de los ratones 35 días después de la implantación. Sin embargo, en forma similar a los resultados en el Experimento MC38 #1, mGITR.7.mg2a (Figura 48D) indujo la inhibición más importante del crecimiento tumoral, ya que 2 de los 9 ratones quedaron libres de tumores. Los anticuerpos anti-GITR-2b de ratón y de rata también redujeron significativamente la velocidad de crecimiento tumoral en forma similar (Figuras 48E y 48F), aunque el anticuerpo 2b de rata produjo 1 ratón libre de tumores, mientras que el anticuerpo 2b de ratón no produjo ratones libres de tumores 35 días después de la implantación.

Los cambios en la media de los volúmenes tumorales y en la mediana de los volúmenes tumorales se muestran en las Figuras 49A y 49B. Las tendencias son similares a aquellas observadas en el Experimento MC38 1, excepto que el isotipo IgG2a anti-GITR era el inhibidor más potente del crecimiento tumoral de MC38, mientras que el isotipo IgG2b exhibe potencia considerable, pero menor, en la inhibición del crecimiento tumoral. Los isotipos IgG1 e IgG1-D265A mostraron un nivel bajo de inhibición del crecimiento tumoral en comparación con la IgG de ratón de control.

Los efectos de los diferentes isotipos anti-GITR sobre las poblaciones de T_{reg} en TIL y bazo de los ratones tratados se muestran en la Figura 50. Como se observó en el Experimento #1, ninguna de las variantes de isotipo que se evaluaron tuvo un gran efecto en el porcentaje de los T_{reg} $CD4^+Foxp3^+$ en el bazo: el efecto más fuerte fue un aumento menor que 40 % inducido por el tratamiento con el isotipo IgG2b de rata anti-GITR, mientras que el isotipo IgG2b de ratón anti-GITR redujo en forma mínima el porcentaje de T_{reg} $CD4^+Foxp3^+$. Los otros isotipos anti-GITR evaluados y el anticuerpo IgG2a anti-CTLA-4 (9D9-mG2a) aumentaron en forma mínima el porcentaje de T_{reg} (Figura 50A).

Por el contrario, en TIL, con la excepción del isotipo IgG1, que no causó cambios en comparación con el control del isotipo, todos los anticuerpos evaluados indujeron reducciones significativas en el porcentaje de T_{reg} . El anticuerpo anti-CTLA-4 9D9-mG2a causó una reducción de aproximadamente 4 veces en el nivel de T_{reg} $CD4^+Foxp3^+$ en comparación con el isotipo IgG1; los isotipos 2a y 2b de ratón anti-GITR y el isotipo 2b de rata redujeron el nivel de T_{reg} alrededor del doble, y el IgG1-D265A mutante causó una reducción apenas menor (Figura 50B). Estos datos confirman los efectos observados en el Experimento #1 al demostrar que los isotipos

anti-GITR mG2a, mG2b y rG2b inducen una reducción significativa de T_{reg} en el entorno tumoral, lo cual se correlaciona con la inhibición del crecimiento tumoral.

Los datos obtenidos en el Experimento MC38 #2 son consistentes con aquellos obtenidos en el Experimento #1, lo cual sugiere que la agregabilidad de los anticuerpos no interfirió de manera indebida en las actividades de los anticuerpos. Posiblemente, los anticuerpos agregados se purgan rápidamente en los ratones, y, por lo tanto, la agregabilidad de los anticuerpos puede no ser un problema significativo en estos ensayos *in vivo*.

Ejemplo 17: Actividad antitumoral de variantes de isotipos anti-GITR en un modelo de tumor Sa1N en etapas

La actividad antitumoral de anti-GITR también se evaluó en un modelo de sarcoma Sa1N en ratones A/J. Se inyectaron en forma subcutánea 2×10^6 células Sa1N por implante a ratones. Después de 7 días, se determinaron los volúmenes tumorales, y los ratones se aleatorizaron en grupos de tratamiento para obtener la media de los volúmenes tumorales comparable (alrededor de $75 \text{ mm}^3/2$). Se administraron por vía IP anticuerpos anti-GITR (DTA-1) modificados por ingeniería genética para tener diferentes isotipos como se describe en el Ejemplo 10, Experimento MC38 #1, los días 7, 10 y 12 a 200 μg por dosis.

Los efectos sobre el crecimiento tumoral se muestran en la Figura 51. El tratamiento con el anticuerpo anti-GITR IgG2a inhibió por completo el crecimiento tumoral y los 10 ratones estaban libres de tumores para el día 20 después de la implantación (Figura 51B), y el isotipo IgG2b de rata tuvo un efecto similar sobre 9 de 10 ratones que estaban libres de tumores para el día 20 (Figura 51C). Los isotipos IgG1 (Figura 51D) e IgG1D265A (Figura 51E) inhibieron los tumores en cierta medida, en comparación con el crecimiento desinhibido de los tumores tratados con el control de isotipo IgG1 (Figura 51A), pero la inhibición fue mucho menor que la observada con los isotipos mIgG2a y rIgG2b. Los cambios en la media de los volúmenes tumorales y en la mediana de los volúmenes tumorales, que se muestran en las Figuras 52A y 52B, confirman el efecto inhibidor virtualmente completo de los anticuerpos mIgG2a y rIgG2b sobre el crecimiento tumoral, en comparación con la inhibición mucho menor del crecimiento tumoral exhibida por los isotipos mIgG1 y mIgG1-D265A.

En forma conjunta, los datos de las Figuras 51 y 52 confirman los datos obtenidos con el modelo de tumor MC38 (Ejemplo 10) que muestran que los isotipos mIgG2a y rIgG2b anti-GITR exhiben actividad antitumoral potente, en comparación

con los isotipos mlgG1 (y mlgG1-D265A), que exhiben una actividad antitumoral mucho menor. La actividad antitumoral en el modelo Sa1N de los anticuerpos mlgG1 y la variante D265A es consistente con los efectos agonistas de GITR sin reducción de T_{reg}.

Los efectos de los diferentes isotipos anti-GITR sobre las poblaciones de T_{reg} en TIL y bazo con Sa1N de los ratones tratados se muestran en la Figura 53. Todas las variantes del isotipo anti-GITR evaluadas indujeron aumentos relativamente pequeños de alrededor de 20-40 % en el nivel de T_{reg} CD4⁺Foxp3⁺ en el bazo. El mayor aumento se produjo mediante el tratamiento con el isotipo IgG2a anti-GITR, que causó el mismo aumento que el tratamiento con los anticuerpos IgG2b (9D9-G2b) e IgG1-D265A anti-CTLA-4 (9D9-G1-D265A) (Figura 53A). Los isotipos anti-CTLA-4 mencionados se usaron como controles positivos en este estudio de GITR, ya que la reducción de T_{reg} se había observado con el isotipo IgG2b.

En comparación con el efecto de T_{reg} en la periferia, los isotipos m2a y r2b anti-GITR, así como los isotipos 2b anti-CTLA-4, disminuyeron los niveles de T_{reg} en el sitio del tumor al menos 3,5 veces (Figura 53B). El isotipo IgG1 anti-GITR y el mutante de IgG1-D265A indujeron reducciones menores de alrededor de 35 % en el porcentaje de T_{reg}, mientras que el mutante de IgG1-D265A anti-CTLA-4 no causó cambios en el porcentaje de T_{reg} en TIL (Figura 53B). Por lo tanto, como se observó en el modelo de tumor MC38, los isotipos mG2a y rG2b anti-GITR indujeron una reducción significativa de T_{reg} en el entorno tumoral, mucho mayor que los anticuerpos IgG1 e IgG1-D265A, lo cual se correlaciona con la inhibición del crecimiento tumoral.

Ejemplo 18: Actividad sinérgica con combinación de anticuerpo anti-GITR y anticuerpo anti-PD1 antagonista

Para determinar si se podía obtener un efecto antitumoral sinérgico combinando anticuerpo DTA-1 con un anticuerpo que antagoniza PD-1, una molécula que proporciona una señal inhibidora para mecanismos antitumorales, se evaluó el efecto de la combinación de anticuerpos sobre el volumen del tumor usando un modelo de adenocarcinoma de colon MC38 en etapas. Los ratones se trataron con (A) mlgG1 de control, (B) mlgG + DTA-1, (C) mlgG + PD-1 (clone 4H2, BMS) y (D) PD-1 + DTA-1 los días 7, 10 y 14.

Los efectos sobre el crecimiento tumoral se muestran en la Figura 54. El tratamiento con el anticuerpo DTA-1 o el anticuerpo anti-PD-1 en forma individual inhibió el crecimiento tumoral en cierta medida, y 2 de 10 ratones quedaron libres de

tumores. Por el contrario, la combinación del anticuerpo DTA-1 y el anticuerpo anti-PD-1 aumentó de manera sustancial la cantidad de ratones libres de tumores para el día 30, y 7 de 10 ratones quedaron libres de tumores. Como se esperaba, no quedaron ratones libres de tumores entre los ratones a los que se les administró mlgG de control.

Estos resultados sugieren que la combinación de anticuerpos anti-GITR agonistas y anticuerpos anti-PD-1 antagonistas actúa sinérgicamente para inhibir el crecimiento tumoral.

Ejemplo 19: Efecto de las mutaciones de aminoácidos CDR sobre la afinidad de fijación

Este ejemplo muestra que algunos residuos de aminoácidos en la CDR3 de VH de 28F3 se pueden mutar a otro aminoácido sin afectar en forma significativa su afinidad de fijación.

Se crearon 48 mutantes de 28F3 mutando uno o más de los siguientes aminoácidos en la CDR3 de VH: M102, D106 y M111 (numeración de acuerdo con SEQ ID NO: 13), y se evaluaron las siguientes actividades: fijación a células 3A9-hGITR y secreción de IL-2 de células 3A9-hGITR en presencia de anti-CD3 unido a placa. Los experimentos se llevaron a cabo como se describió anteriormente.

Los resultados se muestran en las Figuras 55A y 55B (fijación a células 3A9-hGITR), las Figuras 56A-F (secreción de IL-2) y la Tabla 7.

Tabla 7: Efectos de las mutaciones de aminoácidos CDR sobre la afinidad de fijación

Referencias en las Figuras 55 y 56	Mutaciones	EC50 para la actividad anticuerpo células 3A9	EC50 para la fijación del anticuerpo mediante FACS
A1	M98V, M111L	1,731	0,5297
B1	M98F, M111L		7,762
C1	M98L, M111L	0,674	0,101
D1	M98I, M111L	0,218	0,155
E1	M98Q, M111L	3,274	3,259
F1	M98S, M111L		9,037
G1	M98A, M111L		28,02
H1	M98Y, M111L		92,92
A2	M98V, M111F	1,338	0,5543
B2	M98F, M111F		~399,9
C2	M98L, M111F		0,2066
D2	M98I, M111F	0,1326	0,1999

Referencias en las Figuras 55 y 56	Mutaciones	EC50 para la actividad anticuerpo células 3A9	EC50 para la fijación del anticuerpo mediante FACS
E2	M98Q, M111F		2,489
F2	M98S, M111F		36,81
G2	M98A, M111F		25,59
H2	M98Y, M111F		36,83
A3	M98V, D106E, M111L	0,7144	0,4297
B3	M98F, D106E, M111L		62,56
C3	M98L, D106E, M111L	1,037	0,1824
D3	M98I, D106E, M111L	0,0883	0,1602
E3	M98Q, D106E, M111L		3,054
F3	M98S, D106E, M111L		~187,0
G3	M98A, D106E, M111L		9,292
H3	M98Y, D106E, M111L		27,37
A4	M98V, D106E, M111F		0,1157
B4	M98F, D106E, M111F		8,097
C4	M98L, D106E, M111F	0,2618	0,09559
D4	M98Q, D106E, M111F	0,4539	0,4984
E4	M98S, D106E, M111F		~5.77e+006
F4	M98A, D106E, M111F	0,2613	2,86
G4	M98Y, D106E, M111F		6,752
H4	M98V, D106E	0,01499	0,08696
A5	M98F, D106E		0,1024
B5	M98L, D106E	0,02552	0,04658
C5	M98I, D106E	0,02048	0,05227
D5	M98Q, D106E	0,04963	0,1451
E5	M98S, D106E	1,01	0,3437
F5	M98A, D106E	0,06304	0,06008
G5	M98Y, D106E	1,081	0,1196
H5	M98V	0,05336	0,05104

Referencias en las Figuras 55 y 56	Mutaciones	EC50 para la actividad del anticuerpo en células 3A9	EC50 para la fijación del anticuerpo mediante FACS
A6	M98F		0,1194
B6	M98L	0,1104	0,1136
C6	M98I	0,1104	0,2126
D6	M98Q	0,08124	0,2155
E6	M98S	0,1226	0,526
F6	M98A	3,491	0,225
G6	M98Y		0,252
H6	28F3 no mutado	0,0418	0,05002

Los resultados indican que varios mutantes tienen una fijación y una actividad comparables a 28F3, mientras que otras mutaciones reducen la fijación o la secreción de IL-2, o ambas. Los siguientes mutantes tienen datos de fijación y de actividad comparables: M98V; M98V/D106E; M98L/D106E; M98I/D160E y M98A/D106E.

Ejemplo 20: Efectos de las modificaciones de la región constante sobre la actividad agonista del anticuerpo GITR

Este ejemplo demuestra que los anticuerpos GITR que comprenden una bisagra de IgG2 tienen una mayor capacidad para inducir la secreción de IL-2 y IFN- γ de linfocitos T en relación con los mismos anticuerpos que tienen una bisagra de IgG1.

Se observó en los ensayos con CHO-OKT3 y 3A9 descritos anteriormente que los anticuerpos derivados de hibridomas, que tienen una región constante de IgG2, son más potentes en la estimulación de la secreción de citocina que los mismos anticuerpos en los que la región constante de la cadena pesada se intercambió por la de IgG1 o una IgG1 no efectora (IgG1.1). Por lo tanto, el efecto de una región constante de IgG2 o una bisagra de IgG2 se evaluó en anticuerpos anti-GITR en estos ensayos.

La región variable de la cadena pesada de un anticuerpo GITR antihumano se unió a las siguientes regiones constantes de la cadena pesada:

Tabla 8: Configuraciones de la región constante de los anticuerpos anti-GITR ejemplificados

Nombre del anticuerpo	CH1	Bisagra	CH2	CH3	SEQ ID NO*
anti-GITR	IgG2 SEQ ID NO:279	IgG2 SEQ ID NO:291	IgG2 SEQ ID NO:297	IgG2 SEQ ID NO:298	SEQ ID NO:221
-IgG2 anti-GITR	IgG2 SEQ ID	IgG2 SEQ ID NO:291	IgG2 SEQ ID	IgG2 SEQ ID	SEQ ID NO:221

	NO:279		NO:297	NO:298	
IgG1 anti-GITR	IgG1 SEQ ID NO:278	IgG1 SEQ ID NO:295	IgG1 SEQ ID NO:280	IgG1 SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:7
-IgG1.1 anti-GITR	IgG1.1 SEQ ID NO:278	IgG1.1 (L234A/L235E/G237A) SEQ ID NO:296	IgG1.1 (A330S/P331S) SEQ ID NO:281	IgG1.1 SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:11
-IgG2-IgG1 anti-GITR o anti-GITR.g2.g1	IgG2 SEQ ID NO:279	híbrido de IgG2/IgG1 SEQ ID NO:293	IgG1 SEQ ID NO:280	IgG1 SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:223
-IgG2-IgG1.1 anti-GITR o anti-GITR.g2.g1.1	IgG2 SEQ ID NO:279	IgG2 SEQ ID NO:291	IgG1.1 (A330S/P331S) SEQ ID NO:281	IgG1 SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:224

Primero, las afinidades de fijación de estos anticuerpos GITR se compararon con aquellas de los anticuerpos GITR que tienen una bisagra de IgG1. Las afinidades de fijación se determinaron como se describe en el Ejemplo 2. Como se muestra en la Figura 57, los tres anticuerpos GITR que tienen una bisagra de IgG2 tuvieron afinidades similares con linfocitos T activados, como los dos anticuerpos GITR que tienen una bisagra de IgG1.

Luego, la capacidad de los anticuerpos GITR que tienen una región constante de IgG1 o una bisagra de IgG2/un dominio Fc de IgG1 se evaluó para determinar si pueden inducir la secreción de IL-2 e IFN- γ en linfocitos T estimulados con células CHO que expresan OKT3, como se describe en el Ejemplo 13. Como se muestra en las Figuras 58A y 58B, el anticuerpo con la bisagra de IgG2/el dominio Fc de IgG1 ("anti-GITR.G2.g1f") indujo la secreción de IFN- γ e IL-2 en linfocitos T en un grado mayor que el anticuerpo con la región constante de IgG1 ("anti-GITR.g1f"). Se obtuvieron resultados similares con las versiones no efectoras de estos dominios constantes (Figuras 58C).

Para confirmar la mayor activación de linfocitos T con los anticuerpos anti-GITR que comprenden una bisagra de IgG2, se evaluó la secreción de IL-2 en un formato experimental diferente. En este experimento, se evaluó la capacidad de los anticuerpos GITR de inducir la secreción de IL-2 en células 3A9-hGITR (línea celular hibridoma 3A9 de linfocito T de ratón que expresa ectópicamente GITR humano), como se describe en el Ejemplo 13. Como se muestra en la Figura 59, todos los anticuerpos que tienen la bisagra de IgG2 (anti-GITR.g2, anti-GITR.g2.g1f y anti-GITR.g2.g1.1f) indujeron la secreción de IL-2 en células 3A9-hGITR en un grado mayor que sus contrapartes que contienen una región constante de IgG1 (anti-

GITR.g1f y anti-GITR.g1.1f").

En forma conjunta, estos resultados sugieren que los anticuerpos anti-GITR que tienen una bisagra de IgG2 y regiones constantes de g1 o g1.1 son más potentes que los mismos anticuerpos que tienen una bisagra de IgG1. Un mecanismo posible para explicar los efectos mejorados de los anticuerpos GITR que contienen una bisagra de IgG2 es el aumento de la internalización y/o el aumento de la formación de complejos de estos anticuerpos en la superficie celular en relación con los mismos anticuerpos que comprenden una bisagra de IgG1.

Ejemplo 21: La proliferación inducida por anticuerpos anti-GITR es intrínseca en linfocitos Teff

GITR se encuentra expresado en linfocitos T reguladores (Treg) de ratón y ser humano. Los datos en la literatura demostraron que los anticuerpos anti-GITR agonistas impulsan la proliferación de linfocitos T efectores (Teff) CD4+Foxp3- en presencia de linfocitos Treg. De manera adicional, se sugirió que este efecto es impulsado, en primer lugar, por la fijación del anticuerpo anti-GITR a linfocitos Teff en lugar de causar un efecto directo sobre la función supresora de linfocitos Treg. Otras publicaciones muestran que los anticuerpos anti-GITR impulsan la proliferación de linfocitos Treg y pueden inducir inestabilidad en el linaje de linfocitos Treg caracterizada por la pérdida de Foxp3.

Para examinar los efectos de los anticuerpos anti-GITR sobre la función de los linfocitos Treg, se realizó un ensayo de supresión de linfocitos Treg en el que los linfocitos Teff se estimularon con anti-CD3 y diversos isotipos de mAb DTA-1 anti-GITR de ratón en presencia de APC y cantidades tituladoras de linfocitos Treg. Los resultados mostraron que el tratamiento con anticuerpo DTA-1 aumentó la proliferación en comparación con un control de isotipo. Además, los isotipos IgG1, 2a, 2b e IgG1 D265A inerte resultaron eficaces en el aumento de la proliferación de linfocitos Teff, lo cual demuestra que la fijación a FcR no es necesaria para la función del anticuerpo anti-GITR en este sistema.

En el experimento anterior, no era claro si el aumento en la proliferación de Teff se debió a la acción de los anticuerpos anti-GITR sobre los linfocitos Treg y/o Teff. Para referirse a esta cuestión, se usaron ratones "knock-in" con GITR humano (huGITR KI). En estos ratones, el gen que codifica GITR de ratón, *Tnfrsf18*, se reemplazó por el gen *TNFRSF18* humano, y GITR humano se encuentra expresado en forma similar a muGITR en ratones de tipo silvestre; GITR humano se encuentra

expresado en linfocitos Teff y Treg con niveles más elevados en el último. Se descubrió que el mAb 28F3 anti-GITR humano tenía la capacidad de impulsar la proliferación de linfocitos Teff de ratones huGITR KI. Debido a que 28F3 se fija a GITR humano, pero no a GITR de ratón, fue posible establecer un sistema de ensayo de supresión de Treg en el que GITR podía estar dirigido de manera diferencial a linfocitos Teff y Treg. Este sistema también permitió la examinación de las diferencias funcionales entre 28F3 ya sea con una región Fc de IgG1 humana o IgG1.1 inerte.

Los linfocitos Treg y Teff se clasificaron en función de la expresión de CD4 y CD25 de ratones huGITR KI y de tipo silvestre (WT). Los linfocitos Treg y Teff WT y huGITR se mezclaron en combinaciones que permitieron el direccionamiento unicompartimental de linfocitos Treg o Teff con 28F3 (linfocitos Teff de huGITR KI con linfocitos Treg de tipo silvestre, etc.). Como controles, se incluyeron las condiciones en las que 28F3 se pudo fijar a ambos linfocitos Treg y Teff o a ninguno de ellos. Los cultivos que contienen linfocitos Teff y Treg se estimularon con anti-CD3 en presencia de APC, y 28F3 IgG1, 28F3 IgG1.1 o un control de isotipo.

Los resultados se proporcionan en la Figura 60. Como se esperaba, se observó un aumento en la proliferación de linfocitos Teff cuando 28F3 se fijó a ambos linfocitos Treg y Teff, y este efecto se mantuvo en la condición en que 28F3 se pudo fijar solo a linfocitos Teff. Por el contrario, cuando 28F3 solo pudo fijarse a linfocitos Treg, no hubo un aumento en la proliferación de Teff durante el control de isotipo. En cuanto al isotipo, no hubo diferencia entre la Fc de IgG1 e IgG1.1 en las condiciones en las que 28F3 mostró tener efecto. Esto coincide con los datos descritos anteriormente que muestran que no es necesaria la reticulación de Fc para el agonismo de anti-GITR. Si se toman juntos, en este sistema, los anticuerpos anti-GITR actúan, en principio, a través de su capacidad de modular la función de los linfocitos Teff y no a través de la inhibición de la capacidad supresora de linfocitos Treg. Sin embargo, esto no excluye una función de señalización de GITR en linfocitos Treg *in vivo*, ya que los anticuerpos anti-GITR pueden impulsar la proliferación de linfocitos Treg o proporcionar una diana específica de Treg para ADCC o ADCP.

Ejemplo 22: Citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC)

Se evaluó la actividad ADCC *in vitro* de 28F3.IgG1f y 28F3.IgG1.1f usando células NK92/CD16 o células NK primarias como efectores, y se usaron como dianas una variedad de células que expresan GITR.

Tres días antes del ensayo, los linfocitos T CD4+ y CD8+ diana se aislaron

mediante selección negativa, y los Tregs se aislaron adicionalmente de los linfocitos T CD4+ mediante selección positiva de CD25. Cada uno de los subconjuntos de linfocitos T se estimuló durante 3 días con microesferas de CD2/CD3/CD28 (Miltenyi Biotec) para inducir la regulación ascendente de GITR. Un día antes del ensayo, se aislaron células NK primarias de PBMC frescas mediante selección negativa (StemCell Technologies, Inc) y se incubaron durante la noche en medio MyeloCult H5100 (StemCell) enriquecido con 500IU/ml de IL-2 recombinante (R&D Systems) y 1uM de hidrocortisona (StemCell). El día del ensayo, las células efectoras (células NK primarias o NK92/CD16) se incubaron con linfocitos T activados etiquetados con calceína AM en proporciones específicas de efector y diana en presencia de 1 ug/ml de 28F3.IgG1f y 28F3.IgG1.1f.

Al usar células NK primarias o células NK92/CD16 como efectores, 28F3.IgG1 indujo la lisis de linfocitos Treg y efectores T CD4+ activados, aunque se observó menos lisis de linfocitos T CD8+ activados (Figura 61). Como se esperaba, 28F3.IgG1.1 no medió ADCC de ninguna célula diana usando NK92 o células NK primarias como efectores. Por lo tanto, 28F3.IgG1 indujo la lisis de linfocitos Treg y efectores T CD4+ activados y, en menor medida, linfocitos T CD8+ activados, y el nivel de lisis inducido por 28F3.IgG1 parece ser proporcional al nivel de expresión de GITR en las células diana.

Ejemplo 23: Actividad del anticuerpo 28F3.IgG1 en ratones knock-in con GITR humano

Este Ejemplo muestra que 28F3.IgG1 y 28F3IgG1.1 tienen actividad antitumoral en tumores MC38 en ratones C57BL/6 que tienen sistema inmunitario humano y proteína de GITR humano, y la actividad antitumoral es más fuerte con 28F3.IgG1.

Generación de ratones knock-in con GITR humano: Los ratones C57BL/6 se modificaron por ingeniería genética para expresar el dominio extracelular (ECD) de GITR humano en lugar del dominio extracelular de GITR de ratón, y las secuencias de transmembrana y citoplasmática se mantuvieron intactas. La expresión de GITR quimérico de ratón/humano se confirmó mediante la tinción de células de bazo activadas con anti-CD3/CD28 con un anticuerpo GITR humano.

Las células MC38 se cultivaron en medio DMEM con 10 % de suero bovino fetal termoinactivado (FBS), 2 mM de L-glutamina, 4,5 g/l (45 %) de glucosa (10 ml/l) y 1 mM de piruvato de sodio (10 ml/l). Las células se dividieron 1:10 cada 2 días. Se usaron dos cohortes de ratones y, para ambas cohortes, se implantaron en forma

subcutánea en el flanco derecho de cada ratón 0,75 millones de células MC38 en 0,2 ml de PBS, usando una jeringa de 1-cm³ y una aguja de calibre 25 de media pulgada. Para la cohorte 1, el día 7 después de la implantación, se aleatorizaron 40 ratones en 3 grupos de 12-13 ratones cada uno, de acuerdo con el volumen tumoral ($L \times W \times H/2$). Todos los grupos tenían volúmenes tumorales promedio de aproximadamente 174 mm^{3/2}. Los días 7, 10 y 14, se administró vehículo de control o mAb a 10 mg/kg. Para la cohorte 2, el día 7 después de la implantación, se aleatorizaron 10 ratones en 2 grupos de 5 ratones cada uno, de acuerdo con el volumen tumoral ($L \times W \times H/2$). Todos los grupos tenían volúmenes tumorales promedio de aproximadamente 69 mm^{3/2}. Los días 7, 10 y 14, se administró vehículo de control o mAb 28F3.IgG1 a 10 mg/kg.

Las administraciones a los ratones se hicieron por vía intraperitoneal (IP) en las concentraciones y fechas resumidas en la Tabla 9.

Tabla 9.

Grupos	Días después de la implantación
Isotipo IgG1, 10 mg/kg	7, 10 y 14
28F3.IgG1, 10 mg/kg	7, 10 y 14
28F3.IgG1.1f, 10 mg/kg	7, 10 y 14

Los tumores y pesos corporales se midieron dos veces por semana hasta la finalización del estudio. Los tumores se midieron en 3 dimensiones con un calibre digital electrónico Fowler (Model 62379-531; Fred V. Fowler Co., Newton, MA), y los datos se registraron electrónicamente usando el software StudyDirector de Studylog Systems, Inc. (San Francisco del Sur, CA).

En este estudio de tumores, la cohorte 1 se terminó el día 52 después de la implantación. Se usó Microsoft Excel para calcular los valores de la media, la mediana y la desviación estándar (SD) de los volúmenes tumorales y los pesos corporales. Los valores de la media y la mediana se calcularon cuando el 100 % y, al menos, el 60 % de los animales de estudio estaban en cada grupo de tratamiento, respectivamente. Los tumores de los ratones de la cohorte 2 se recolectaron el día 15.

Los resultados indican que, el día 22 después de la implantación del tumor, el último día cuando todos los ratones del estudio estaban vivos, la dosis de 10 mg/kg de 28F3.IgG1 mostró un 67 % de inhibición media del crecimiento tumoral (TGI) en xenoinjertos MC38 en comparación con el anticuerpo de control de isotipo. La inhibición del crecimiento tumoral se resume por grupo de tratamiento en la Tabla 10.

Las curvas de crecimiento tumoral por grupo de tratamiento se muestran en **Error! Reference source not found.** La media y la mediana de las curvas de crecimiento tumoral por grupo de tratamiento se presentan en las Figuras 63A-63B. No hubo toxicidad aparente en ningún grupo de tratamiento, ya que los cambios en la media y la mediana del peso corporal fueron inferiores al 20 %. Los pesos corporales de los ratones y los cambios con el transcurso del tiempo se muestran en las Figuras 64A-64B.

Tabla 10.

Grupo de tratamiento	Día 22		Día 25		
	Media del volumen tumoral (mm ³)	TGI (%)	Mediana del volumen tumoral (mm ³)	TGI (%)	
Isotipo IgG1, 10 mg/kg	1342	N/A	1790	A	N/
28F3.IgG1, 10 mg/kg	447	67	380		79
28F3.IgG1.1f, 10 mg/kg	1049	22	1064		41

Los resultados muestran que 28F3.IgG1 tuvo un 67 % de inhibición del crecimiento tumoral (TGI), mientras que 28F3.IgG1.1f tuvo un 22 % de TGI el día 22 después de la implantación, lo cual indica que ambos anticuerpos redujeron el crecimiento tumoral en el modelo de tumor MC38. Además, los resultados sugieren que la fijación a Fc por parte de 28F3.IgG1 mejora la potencia antitumoral en el modelo de tumor MC38.

Para investigar el efecto que 28F3.IgG1 tiene sobre poblaciones de linfocitos T, se recolectaron tejidos de 5 ratones en cada grupo de tratamiento el día 15 después de la implantación. Se procesaron los bazo y los tumores en un disociador gentleMACS Octo™ (Miltenyi, San Diego, CA). Se tiñeron suspensiones de células simples para determinar marcadores de linfocitos T usando citometría de flujo (FACS). Se detectó fluorescencia de los anticuerpos mediante citometría de flujo en Fortessa (BD Biosciences, San Jose, CA), y los resultados se analizaron con el programa informático Flowjo (Flowjo, LLC, Ashland, OR).

Los resultados, que se muestran en las Figuras 65 y 66, muestran un porcentaje reducido de linfocitos Treg, consistente con la reducción en los ratones tratados con 28F3.IgG1 en relación con el control de isotipo (Figura 65). Por el contrario, hubo un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD8+ en el grupo 28F3.IgG1 (Figura 66).

Por lo tanto, el control inmunitario en ratones tratados con 28F3.IgG1 en

comparación con el control de isotipo sugiere que la TGI puede estar mediada por la reducción de Treg y un aumento en los linfocitos T CD8+.

Ejemplo 24: La reticulación de 28F3.IgG1 aumenta su potencia

Este ejemplo muestra que la reticulación de 28F3.IgG1 aumenta su potencia para mejorar la secreción de IFN- γ en linfocitos T y promueve la proliferación de linfocitos T.

Los linfocitos T se cocultivaron con células CHO-OKT3 o CHO-OKT3-CD32a^{high} en presencia de varias concentraciones de anticuerpos anti-GITR o reactivos de control, y se midieron los niveles de secreción de interferón- γ (IFN- γ) y de proliferación celular. La línea celular CHO-OKT3-CD32^{high} tiene un nivel muy alto de receptor Fc CD32a y una expresión de OKT3 apenas mayor que su clon progenitor CHO-OKT3.

El ensayo se llevó a cabo de la siguiente manera. Los linfocitos T respondedores se obtuvieron de PBMC humanas aisladas mediante gradiente Ficoll (Amersham Bioscience 17-1440-03) con el kit de aislamiento de linfocitos T CD4 (Life technologies, Cat. 113.31D) y microesferas CD25 (Miltenyi, Cat. 130-092-983) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células CHO que expresan anti-CD3scFv (OKT3) (CHO-OKT3) o las células CHO que expresan anti-CD3scFv y CD32a, que se lavaron dos veces con medio RPMI, se sometieron a irradiación con una dosis de 50K Rad. Las células se recolectaron y se volvieron a suspender en medio de cultivo (RPMI-1640 enriquecido con 10 % de suero bovino fetal, 2mM de L-glutamina, 55 nM de β -Mercaptoetanol, 1 mM de piruvato de sodio y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina) a $2,5 \times 10^5$ /ml. Se sembraron $2,5 \times 10^4$ células CHO y 1×10^5 linfocitos T por cavidad en una placa de cultivo tisular de fondo plano de 96 cavidades (Costar). Las células se incubaron con una titulación cuádruple de 8 puntos de anticuerpo GITR a partir de 20 μ g/ml. Se agregó hIgG1 no relacionada a 20 μ g/ml como control de isotipo. Se incluyó una muestra con células solo para mostrar actividad de referencia sin tratamiento. El sobrenadante de cada muestra se recolectó el día 3 para la medición de IFN- γ (kit ELISA para IFN- γ humano BD optEIA; BD Bioscience#555142). La proliferación celular se evaluó mediante la incorporación de ³H-timidina durante las últimas 8 horas de incubación. Los resultados, que se muestran en las Figuras 67 y 68, indican que, en presencia de 28F3.IgG1, se segrega más IFN- γ de los linfocitos T que se cocultivaron con CHO-OKT3-CD32a^{high} en relación con aquellos que se cocultivaron con células CHO-OKT3 (Figura 67). Como se esperaba,

no se observó una diferencia significativa con el anticuerpo 28F3.IgG1.1f no efector, que no se fija a CD32a. Además, en presencia de 28F3.IgG1, se observó mayor proliferación de linfocitos T en linfocitos T que se cocultivaron con CHO-OKT3-CD32a^{high} en relación con aquellos que se cocultivaron con células CHO-OKT3; este efecto no se observó con el anticuerpo 28F3.IgG1.1f no efector (Figura 68). Por lo tanto, la reticulación de 28F3.IgG1 aumenta su potencia para mejorar la secreción de IFN- γ en linfocitos T y promover la proliferación de linfocitos T. Este efecto potenciador también se observó en la proliferación de linfocitos T con células CHO-OKT3 que expresan niveles más bajos de CD32a. GITR.6 g1.1f muestra niveles más altos de IFN- γ y cuando se reticula, en comparación con cuando es soluble. Posiblemente, esto sea un reflejo de un nivel apenas más alto de OKT3 expresado en células CHO-OKT3-CD32a^{high} en relación con células CHO-OKT3. El aumento observado con GITR.6 g1f reticulado es mayor que el observado con el isotipo inerte, lo cual sugiere un beneficio de la reticulación. La versión G1f promueve niveles altos de IFN- γ y incluso en dosis bajas cuando los anticuerpos solubles demostraron poco agonismo con respecto al fondo, lo cual sugiere también una función positiva de la reticulación.

Por lo tanto, el anticuerpo 28F3.IgG1 y el anticuerpo 28F3.IgG1 no efector estimulan la producción de IFN- γ y estimulan la proliferación de linfocitos T, sin embargo, la reticulación de 28F3.IgG1 aumenta adicionalmente su potencia para mejorar la secreción de IFN- γ en linfocitos T y para promover la proliferación de linfocitos T.

TABLA 11: SÍNTESIS DEL LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID	Descripción	Secuencia
1	Isoforma 1 de GITR humano	MAQHGMAGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLLGT GTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGDPCC TTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCK PWTDCQFGFLTVPFGNKTHNAVCPGSPPAEPLGWLTVVLLA VAACVLLLTSAQLGLHIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPSTEDA RSCQFPPEERGERSAEEKGRLGDLWV
2	Isoforma 2 de GITR humano	MAQHGMAGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLLGT GTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGDPCC TTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCK PWTDCWRCRRRPKTPEAASSPRKSGASDRQRRRGWETCGCE PGRPPGPPTAASPSPGAPQAAGALRSALGRALLPWQQKWVQEG GSDQRPGPCSSAAAAGPCRRERETQSWPPSSLAGPDGVGS
3	Isoforma 3 de GITR humano	MAQHGMAGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLLGT GTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGDPCC TTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCK PWTDCQFGFLTVPFGNKTHNAVCPGSPPAEPLGWLTVVLLA VAACVLLLTSAQLGLHIWQLRKQTQLLLEVPSTEDARSCQFPE EERGERSAEEKGRLGDLWV
4	GITR humano (maduro)	QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCS EWDCMCVQPEFHCGDPCCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQ CIDCASGTFSGGHEGHCKPWTDCQFGFLTVPFGNKTHNAVCP PGSPPAEP
5	GITR de <i>Macaca fascicularis</i>	MCASGTLCCALLCAASLGQRPTGGPGCGPGRLLLGTGKDARC CRVHPTTRCCRDYQGECCSEWDCVCVQPEFHCGNPCCTTCQHH PCPSGQGVQPQKFSFGFRCVDCALGTFSRGHDGHCKPWTDCQ QFGFLTVPFGNKTHNAVCPGSPPAEPGWLTIIILLAVAACVL LLTSAQLGLHIWQLRSQPTGPRETQLLLEVPSTEDASSCQFP EEERGERLAEEKGRLGDLWV
6	GITR-L humano	MTLHPSITCEFLFSTALISPKMCLSHLENMPLSHSRTQGAQR SSWKWLWLFCSIWMLLFLCSFSWLIFIFLQLETAKEPCMAKFGP LPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANY NDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSQIYNVGGTYELHVGDTIDL IFNSEHQVLKNNTYWGIIILLANPQFIS
7	Dominio constante de IgG1 humana	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
8	Dominio constante de IgG1 humana (variante alotípica)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
9	Dominio constante de IgG1 humana con mutaciones L234A, L235E y G237A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAEPAEAGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV

		SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
10	Dominio constante de IgG1 humana con mutaciones A330S y P331S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
11	Dominio constante de IgG1.1 humana (mutaciones L234A, L235E, G237A, A330S y P331S)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
12	Región constante de la cadena liviana kappa de IgG1 humana (CL)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13	28F3 (VH)	QVQLVESGEGGVVQPGRSLRLSCAASGFTTFSSYGMHWRQAPGKGLEWVAWIWYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYYGMDVWGQGT TTVTVSS
14	28F3 (VL)	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQFNSYPYTFGQGTKLEIK
15	28F3 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud completa) La región constante está subrayada	QVQLVESGEGGVVQPGRSLRLSCAASGFTTFSSYGMHWRQAPGKGLEWVAWIWYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPMLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
16	28F3 (cadena liviana de tipo silvestre de longitud completa) La región constante está subrayada	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQFNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
17	28F3.IgG1 (VH + IgG1)	QVQLVESGEGGVVQPGRSLRLSCAASGFTTFSSYGMHWRQAPGKGLEWVAWIWYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
18	28F3.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	QVQLVESGEGGVVQPGRSLRLSCAASGFTTFSSYGMHWRQAPGK

		GLEWVAVIWIYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
19	28F3.IgG1 (VL + CL)	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKA PKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATY YCQQFNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
20	28F3 VH CDR1	SYGMH
21	28F3 VH CDR2	VIWYEGSNKYYADSVKG
22	28F3 VH CDR3	GGSMVRGDYYYGMDV
23	28F3 VL CDR1	RASQGISSALA
24	28F3 VL CDR2	DASSLES
25	28F3 VL CDR3	QQFNSYPYT
26	19D3 (VH)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGFHWVRQAPGK GLEWVAVIWIYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGQLDYYYYYVMDVWGQGT TTVTVSS
27	19D3 (VL)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGT KLEIK
28	19D3 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud completa) La región constante está subrayada	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGFHWVRQAPGK GLEWVAVIWIYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGQLDYYYYYVMDVWGQGT TTVTVSSASTKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNV DHKPSNT KVDKTVRKKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST FRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
29	19D3 (cadena liviana de tipo silvestre de longitud completa) La región constante está subrayada	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATY YCQQYNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
30	19D3.IgG1 (VH + IgG1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGFHWVRQAPGK GLEWVAVIWIYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGQLDYYYYYVMDVWGQGT TTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
31	19D3.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGFHWVRQAPGK

		GLEWVAVIWIYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGQLDY YYYVMDVWGQGT TTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVN HKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPKPKDTLM ISRTP E VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
32	19D3.IgG1 (VL + CL)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQYNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
33	19D3 VH CDR1	SYGFH
34	19D3 VH CDR2	VIWIYAGSNKFYADSVKG
35	19D3 VH CDR3	GGQLDY YYYVMDV
36	19D3 VL CDR1	RASQGISSWLA
37	19D3 VL CDR2	AASSLQS
38	19D3 VL CDR3	QQYNSYPYT
39	18E10 (VH)	QVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWIYAGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGRIAVAFYY SMDVWGQGT TTVTVSS
40	18E10 (VL)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
41	18E10 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud completa) La región constante está subrayada	QVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWIYAGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGRIAVAFYY SMDVWGQGT TTVTVSSASTKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNV DHKPSNT KVDKTV ERKCCVECP P PAPPVAGPSVFLFPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST FRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
42	18E10 (cadena liviana de tipo silvestre de longitud completa) La región constante está subrayada	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQYNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
43	18E10.IgG1 (VH + IgG1)	QVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWIYAGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGRIAVAFYY SMDVWGQGT TTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVN HKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTP E VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
44	18E10.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	QVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWIYAGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL

		RAEDTAVYYCARGGRIAVAFYYSMVDWGQGT ^T TVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
45	18E10.IgG1 (VL + CL)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQYNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
46	18E10 VH CDR1	SYGMH
47	18E10 VH CDR2	VIWYAGSNKYYADSVKG
48	18E10 VH CDR3	GGRIAVAFYYSMVDV
49	18E10 VL CDR1	RASQGISSWLA
50	18E10 VL CDR2	AASSLQS
51	18E10 VL CDR3	QQYNSYPYT
52	3C3 (VH)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWTWIRQPPGK GLEWIGKINHSGNTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLGAFDAFDIWGQGTMTVTVSS
53	3C3 (VL1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
54	3C3 (VL2)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWYQQKPGQA PRLIYDASNRATGIPARFSGSGPGTDFTLTISLQPEDFAVY YCQQRSNWHYTFGQGTKLEIK
55	3C3 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud completa) La región constante está subrayada	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWTWIRQPPGK GLEWIGKINHSGNTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLGAFDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
56	3C3 L1 (cadena liviana 1 de tipo silvestre de longitud completa) La región constante está subrayada	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQYNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
57	3C3 L2 (cadena liviana 2 de tipo silvestre de longitud completa) La región constante está subrayada	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWYQQKPGQA PRLIYDASNRATGIPARFSGSGPGTDFTLTISLQPEDFAVY YCQQRSNWHYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
58	3C3.IgG1 (VH + IgG1)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWTWIRQPPGK GLEWIGKINHSGNTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLGAFDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA

		VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
59	3C3.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWTWIRQPPGK GLEWIGKINHSGNTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLGAFDAFDIWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
60	3C3.IgG1 (VL1 + CL)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQYNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
61	3C3IgG1.2 (VL2 + CL)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGPGTDFTLTISLQPEDFAVY YCQQRSNWHYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
62	3C3 VH CDR1	GYWT
63	3C3 VH CDR2	KINHSGNTNYPNPSLKS
64	3C3 VH CDR3	LGAFDAFDI
65	3C3 VL1 CDR1	RASQGISSWLA
66	3C3 VL1 CDR2	AASSLQS
67	3C3 VL1 CDR3	QQYNSYPYT
68	3C3 VL2 CDR1	RASQGVSSYLA
69	3C3 VL2 CDR2	DASNRAT
70	3C3 VL2 CDR3	QQRSNWHY
71	2G6 (VH)	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFI ¹ LS ² DYGMHWVRQAPGK GLEWVTVIWDGSKNFYVDSVKGRFTISRDN ³ SKNTLYLQMN ⁴ SL RVEDTAVYYCARGRLATGHFYVMDVWGQGT ⁵ TVTVSS
72	2G6 (VL)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
73	2G6 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud completa) La región constante está subrayada	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFI ¹ LS ² DYGMHWVRQAPGK GLEWVTVIWDGSKNFYVDSVKGRFTISRDN ³ SKNTLYLQMN ⁴ SL RVEDTAVYYCARGRLATGHFYVMDVWGQGT ⁵ TVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV ⁶ DHKPSN TKVDKTV ⁷ ERKCCVECP ⁸ CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN ⁹ S TFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
74	2G6 (cadena liviana de tipo silvestre de longitud completa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQYNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT

	La región constante está subrayada	<u>ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST</u> <u>YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
75	2G6.IgG1 (VH + IgG1)	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFI ¹ LS ² DYGMHWVRQAPGK GLEWVTVI ³ WYDGSNKFYVDSVKGRFTISRDN ⁴ SKNTLYLQMN ⁵ SL RVEDTAVYYCARGGRLATGHFY ⁶ YMDVWGQGT ⁷ TVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP ⁸ TVTSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV ⁹ TVPS ¹⁰ SSLGTQTYICNVN ¹¹ HKPSN TKVDKRV ¹² EPKSCDKTHTCP ¹³ PCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD ¹⁴ WLN ¹⁵ GKEYKCKV SNKALPAPIEK ¹⁶ TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKG ¹⁷ FYP ¹⁸ SDIAVEWESNGQ ¹⁹ PENNYK ²⁰ TPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNV ²¹ FSCSV ²² MHEALHNHYTQKSLSLSPG
76	2G6.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFI ¹ LS ² DYGMHWVRQAPGK GLEWVTVI ³ WYDGSNKFYVDSVKGRFTISRDN ⁴ SKNTLYLQMN ⁵ SL RVEDTAVYYCARGGRLATGHFY ⁶ YMDVWGQGT ⁷ TVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP ⁸ TVTSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV ⁹ TVPS ¹⁰ SSLGTQTYICNVN ¹¹ HKPSN TKVDKRV ¹² EPKSCDKTHTCP ¹³ PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQD ¹⁴ WLN ¹⁵ GKEYKCKVSNKALPSSI ¹⁶ EKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG ¹⁷ FYP ¹⁸ SDIAVE WESNGQ ¹⁹ PENNYK ²⁰ TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV ²¹ F SCSV ²² MHEALHNHYTQKSLSLSPG
77	2G6.IgG1 (VL + CL)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ¹ ISS ² LQPEDFATY YCQQYNSYPYTFGQGT ³ KL ⁴ EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
78	2G6 VH CDR1	DYGMH
79	2G6 VH CDR2	VIWYDGSNKFYVDSVKG
80	2G6 VH CDR3	GGRLATGHFY ¹ YMDV
81	2G6 VL CDR1	RASQGISSWLA
82	2G6 VL CDR2	AASSLQS
83	2G6 VL CDR3	QQYNSYPYT
84	8A6 (VH)	QVQLVESGGGVVQPG ¹ RSRLSCTASGFTFSSYGMQWVRQAPGK GLEWVAVI ² WYEGSNKY ³ YADSVKGRFTISR ⁴ ENSKNTLYLQMN ⁵ SL RAEDTAVYYCARGGLMVRGLFY ⁶ YGMDVWGQGT ⁷ TVTVSS
85	8A6 (VL)	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKA PKFLIYDASSLES ¹ GVPSRFSGSGSGTDFTLT ² ISS ³ LQPEDFATY YCQQFNSYPYTFGQGT ⁴ KL ⁵ EIK
86	8A6 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud completa) La región constante está subrayada	QVQLVESGGGVVQPG ¹ RSRLSCTASGFTFSSYGMQWVRQAPGK GLEWVAVI ² WYEGSNKY ³ YADSVKGRFTISR ⁴ ENSKNTLYLQMN ⁵ SL RAEDTAVYYCARGGLMVRGLFY ⁶ YGMDVWGQGT ⁷ TVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP ⁸ TVTSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV ⁹ TVPS ¹⁰ NFGTQTYTCNV ¹¹ DHKPSN TKVDKTV ¹² ERKCCVECP ¹³ PCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TFRVSVLTVVHQD ¹⁴ WLN ¹⁵ GKEYKCKVSNKGLPAPIEK ¹⁶ TISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG ¹⁷ FYP ¹⁸ SDIAVEWESN GQ ¹⁹ PENNYK ²⁰ TPPMLDS ²¹ DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV ²² FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
87	8A6 (cadena liviana de tipo silvestre de longitud completa)	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKA PKFLIYDASSLES ¹ GVPSRFSGSGSGTDFTLT ² ISS ³ LQPEDFATY YCQQFNSYPYTFGQGT ⁴ KL ⁵ EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST

	La región constante está subrayada	<u>YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
88	8A6.IgG1 (VH + IgG1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYGMQWVRQAPGK GLEWVAVIWIYEGSNKYYADSVKGRFTISRENSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGLMVRGLFYYGMDVWGQGT ^T TVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
89	8A6.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYGMQWVRQAPGK GLEWVAVIWIYEGSNKYYADSVKGRFTISRENSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGLMVRGLFYYGMDVWGQGT ^T TVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
90	8A6.IgG1 (VL + CL)	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKA PKFLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLT ^I SSQLPEDFATY YCQQFNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS T <u>YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
91	8A6 VH CDR1	SYGMQ
92	8A6 VH CDR2	VIWIYEGSNKYYADSVKG
93	8A6 VH CDR3	GGLMVRGLFYYGMDV
94	8A6 VL CDR1	RASQGISSALA
95	8A6 VL CDR2	DASSLES
96	8A6 VL CDR3	QQFNSYPYT
97	9G7 (VH)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTVWMSWVRQAPGK GLEWVGRIKSKTDGGT ^T DYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLHTEDTAVYYCTTGQLIPYSYYYGMDVWGQGT ^S SVTVSS
98	9G7 (VL1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT ^I SRLEPEDFAV YYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
99	9G7 (VL2)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPERFSGSGSGTDFTLT ^I SRLEPEDFAV YYCQQYGSSPITFGQGTRLEIK
100	9G7 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud completa) La región constante está subrayada	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTVWMSWVRQAPGK GLEWVGRIKSKTDGGT ^T DYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLHTEDTAVYYCTTGQLIPYSYYYGMDVWGQGT ^S SVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKT ^Y TCNV ^D HKPS NTKVDKRVESKYGP ^P CPSCPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSD ^E EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
101	9G7 L2 (cadena liviana 2 de tipo silvestre de longitud	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPERFSGSGSGTDFTLT ^I SRLEPEDFAV

	completa) La región constante está subrayada	<u>YYCQQYGSSPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG</u> <u>TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS</u> <u>TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
102	9G7.IgG1 (VH + IgG1)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSTVWMSWVRQAPGK GLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLHTEDTAVYYCTTGQLIPYSYYYGMDVWGQGTSTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
103	9G7.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSTVWMSWVRQAPGK GLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLHTEDTAVYYCTTGQLIPYSYYYGMDVWGQGTSTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
104	9G7.IgG1 (VL1 + CL)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
105	9G7.IgG1.2 (VL2 + CL)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPERFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSSPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
106	9G7 VH CDR1	TVWMS
107	9G7 VH CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG
108	9G7 VH CDR3	GQLIPYSYYYGMDV
109	9G7 VL1 CDR1	RASQSVSSSYLA
110	9G7 VL1 CDR2	GASSRAT
111	9G7 VL1 CDR3	QQYGSSPWT
112	9G7 VL2 CDR1	RASQSVTSSSYLA
113	9G7 VL2 CDR2	GASSRAT
114	9G7 VL2 CDR3	QQYGSSPIT
115	14E3 (VH)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGK GLEWIGEINHSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQLSLKLSSVT AADTAVYYCARFGSNDAFDIWGQGTMTVTVSS
116	14E3 (VL)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQYNSYPPTFGQGTKVEIK
117	14E3 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud completa) La región constante está	<u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGK</u> <u>GLEWIGEINHSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQLSLKLSSVT</u> <u>AADTAVYYCARFGSNDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLA</u> <u>PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA</u> <u>VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV</u>

	subrayada	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSFLTTLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
118	14E3 (cadena liviana de tipo silvestre de longitud completa) La región constante está subrayada	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQYNSYPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
119	14E3.IgG1 (VH + IgG1)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGK GLEWIGEINHSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQLSLKLSSVT AADTAVYYCARFGSNDADFIDWQGTMTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTTLHQLDNLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
120	14E3.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGK GLEWIGEINHSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQLSLKLSSVT AADTAVYYCARFGSNDADFIDWQGTMTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSFLTTLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
121	14E3.IgG1 (VL + CL)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQYNSYPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
122	14E3 VH CDR1	GYYS
123	14E3 VH CDR2	EINHSGNTYYNPSLKS
124	14E3 VH CDR3	FGSNDADFI
125	14E3 VL CDR1	RASQGISSWLA
126	14E3 VL CDR2	AASSLQS
127	14E3 VL CDR3	QQYNSYPPT
128	19H8 (VH)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGK GLEWMAVIWYGGSNKFYADSVKGRFTISRDNKNSLSLQMNSL RAEDTAVYYCARGGAMVRGVYYYGMDVWGQGTITVTVSS
129	19H8 (VL1)	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKA PKFLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQFNSYPQTFGQGTKVEIK
130	19H8 (VL2)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRATGI PARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVY YCQQRSNWPLTFGGGTKEIK
131	19H8 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGK GLEWMAVIWYGGSNKFYADSVKGRFTISRDNKNSLSLQMNSL RAEDTAVYYCARGGAMVRGVYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKG

	completa) La región constante está subrayada	<u>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSN</u> <u>TKVDKTVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR</u> <u>TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS</u> <u>TFRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG</u> <u>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN</u> <u>GQPENNYKTTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
132	19H8 L1 (cadena liviana 1 de tipo silvestre de longitud completa) La región constante está subrayada	<u>AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKA</u> <u>PKFLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY</u> <u>YCQQFNSYPQTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT</u> <u>ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST</u> <u>YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
133	19H8 L2 (cadena liviana 2 de tipo silvestre de longitud completa)	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA</u> <u>PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVY</u> <u>YCQQRSNWPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT</u> <u>ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST</u> <u>YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
134	19H8.lgG1 (VH + IgG1)	<u>QVQLVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGK</u> <u>GLEWMAVIWYGGSNKFYADSVKGRFTISRDNKNSLSLQMNSL</u> <u>RAEDTAVYYCARGGAMVRGVYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN</u> <u>TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF</u> <u>PPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE</u> <u>VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV</u> <u>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT</u> <u>CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSK</u> <u>LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
135	19H8.lgG1.1 (VH + IgG1.1)	<u>QVQLVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGK</u> <u>GLEWMAVIWYGGSNKFYADSVKGRFTISRDNKNSLSLQMNSL</u> <u>RAEDTAVYYCARGGAMVRGVYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN</u> <u>TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSFLFPPKPKDTL</u> <u>MISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u> <u>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIS</u> <u>KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE</u> <u>WESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF</u> <u>SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
136	19H8.lgG1 (VL1 + CL)	<u>AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKA</u> <u>PKFLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY</u> <u>YCQQFNSYPQTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT</u> <u>ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST</u> <u>YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
137	19H8.lgG1.2 (VL2 + CL)	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA</u> <u>PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVY</u> <u>YCQQRSNWPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT</u> <u>ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST</u> <u>YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
138	19H8 VH CDR1	NYGMH
139	19H8 VH CDR2	VIWYGGSNKFYADSVKG
140	19H8 VH CDR3	GGAMVRGVYYYGMDV
141	19H8 VL1 CDR1	RASQGISSALA
142	19H8 VL1 CDR2	DASSLES
143	19H8 VL1 CDR3	QQFNSYPQT

144	19H8 VL2 CDR1	RASQSVSSYLA
145	19H8 VL2 CDR2	DASNRAT
146	19H8 VL2 CDR3	QQRSNWPLT
147	Secuencia de nucleótidos de 28F3 (VH)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTT CAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGAAGGAAGTAATA AATATTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGGA GTATGGTTCGGGGGGACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGG CCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
148	Secuencia de nucleótidos de 28F3 (VL)	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCAT TAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCT CCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTAC TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT TACTGTCAACAGTTTAAATAGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGG GGACCAAGCTGGAGATCAAA
149	Secuencia de nucleótidos de 28F3 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud completa) La secuencia que codifica la región constante está subrayada	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTT CAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGAAGGAAGTAATA AATATTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGGA GTATGGTTCGGGGGGACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGG CCAAGGGACCACGGTCACCGTCCCTCAGCCTCCACCAAGGGC CCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCG AGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAACCAGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGC GGCGTGACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGG CAGCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGAGT GCCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCCTAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTACGTCGCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGC ACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCGTTGTGCACCAGGACT GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGG CCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCCGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACACCTGACCTGACCTGGTCAA AGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAA
150	Secuencia de nucleótidos de 28F3 (cadena liviana de tipo silvestre de longitud completa)	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCAT TAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCT CCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTAC TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT

	La secuencia que codifica la región constante está subrayada	<u>TACTGTCAACAGTTTAAATAGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGG</u> <u>GGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGT</u> <u>CTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC</u> <u>GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGG</u> <u>CCAAAGTACAGTGGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA</u> <u>CTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC</u> <u>TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG</u> <u>AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT</u> <u>GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT</u>
151	Secuencia de nucleótidos de 28F3.IgG1 (VH + IgG1)	caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc tctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg aaggaagtaa taaatattat gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagggggg agtatgggtc ggggggacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc accgtctcct cagctagcac caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctccctccaag agcacctctg ggggcacagc ggcctgggc tgcctgggtca aggactactt cccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc aggcgcctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcc caggactcta ctccctcagc agcgtgggtga ccgtgccctc cagcagcttg ggcaccacga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag agagttgagc ccaaactctg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa ctcctggggg gaccgtcagt ctctctcttc ccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaacc ctgaggtcac atgcgtgggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaagggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaacatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccagggtc agcctgacct gcctgtgcaa aggtctctat cccagcgaca tcgacgtgga gtgggagagc aatggggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct atagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tcccggggtt ga
152	Secuencia de nucleótidos de 28F3.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc tctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg aaggaagtaa taaatattat gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagggggg agtatgggtc ggggggacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc accgtctcct cagctagcac caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctccctccaag agcacctctg ggggcacagc ggcctgggc tgcctgggtca aggactactt cccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc aggcgcctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcc caggactcta ctccctcagc agcgtgggtga ccgtgccctc cagcagcttg

		ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag agagttgagc ccaaactctg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa gccgaagggg ccccgtcagt ctccctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgata tcccggaccc ctgaggtcac atgctgtgtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtgtgtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaagggtc tccaacaaag ccctcccaag cagcatcgag aaaacatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccagggtc agcctgacct gcctggtcaa aggtttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccc tgcctggactc cgacggctcc ttcttctct atagcaagct caccgtggac aagagcagggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tccccgggtt ga
153	Secuencia de nucleótidos de 28F3.IgG1 (VL + CL)	gccatccagt tgaccacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgctttag cctgggtatca gcagaaacca gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaagtggt ggtcccatca aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatatgtt acccgtacac ttttggccag gggaccaagc tggagatcaa acgtacgggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcga tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag
154	Secuencia de nucleótidos de 19D3 (VH)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAACCTG GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTT CAGTAGCTATGGCTTCCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGCTGGAAGTAATA AATTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTA AGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGAC AGTTGGACTACTACTACTATTACGTTATGGACGTCTGGGGCCA AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
155	Secuencia de nucleótidos de 19D3 (VL)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTACCATCACTTGTGCGGGCAGTCAAGGTAT TAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCC CCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTAC TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT TACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGTACACTTTTGCCAGG GGACCAAGCTGGAGATCAAA
156	Secuencia de nucleótidos de 19D3 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud completa)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAACCTG GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTT CAGTAGCTATGGCTTCCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGCTGGAAGTAATA AATTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG

	La secuencia que codifica la región constante está subrayada	AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTA AGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGAC AGTTGGACTACTACTACTATTACGTTATGGACGTCTGGGGCCA AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCA TCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGA GCACAGCGGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCAC CCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCTGAGTGCC CACCGTGCCACAGCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACG TTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTGTGTGACCCAGGACTGGC TGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCT CCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAACCAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC TGCTCCGGGTAAA
157	Secuencia de nucleótidos de 19D3 (cadena liviana de tipo silvestre de longitud completa) La secuencia que codifica la región constante está subrayada	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTGCGGGCAGTCAGGGTAT TAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCC CCTAAGTCCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTAC TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT TACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGTACACTTTTGCCAGG GGACCAAGCTGGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGT CTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGT GCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGG CCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA CTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
158	Secuencia de nucleótidos de 18E10 (VH)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTT CAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGCTGGAAGTAATA AATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGGC GTATAGCAGTGGCCTTCTACTACAGTATGGACGTCTGGGGCCA AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
159	Secuencia de nucleótidos de 18E10 (VL)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTGCGGGCAGTCAGGGTAT TAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCC CCTAAGTCCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTAC TCTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT TACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGTACACTTTTGCCAGG GGACCAAGCTGGAGATCAAA

160	Secuencia de nucleótidos de 18E10 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud completa)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTT CAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGCTGGAAGTAATA AATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGC GTATAGCAGTGGCCTTCTACTACAGTATGGACGTCTGGGGCCA AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCA TCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGA GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCAGCTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCAC CCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGCGAGTGCC CACCGTGGCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGCAAGACC CCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACG TTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTTGTGCACCAGGACTGGC TGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCCT CCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC TGTCTCCGGGTAAA
161	Secuencia de nucleótidos de 18E10 (cadena liviana de tipo silvestre de longitud completa)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTGGGCGAGTCAGGGTAT TAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCC CCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGATCTGGGAGAGCAATTTAC TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT TACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGTACACTTTTGCCAGG GGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACGTGGGCTGCACCATCTGT CTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG CCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA CTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC TACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
162	Secuencia de nucleótidos de 3C3 (VH)	CAGGTGCAACTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCTT CAGTGGTTACTACTGGACCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGATTGGGAAAATCAATCATAGTGGAACACCA ACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGA CACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACC GCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACTGGGGGCCT TTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGT CTCTTCA
163	Secuencia de nucleótidos de 3C3 (VL1)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTGGGCGAGTCAGGGTAT TAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCC

		CCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTAC TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT TACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGG GGACCAAGCTGGAGATCAAAA
164	Secuencia de nucleótidos de 3C3 (VL2)	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTC CAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGGGTGT TAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCT CCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCA TCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGCCTGGGACAGACTTCAC TCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGAGTTTAT TACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCACACTTTTGGCCAGGGGA CCAAGCTGGAGATCAAAA
165	Secuencia de nucleótidos de 3C3 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud completa) La secuencia que codifica la región constante está subrayada	CAGGTGCAACTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCTT CAGTGGTTACTACTGGACCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGATTGGGAAAATCAATCATAGTGGAAACACCA ACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGA CACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACC GCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACTGGGGGCCT TTGATGCTTTTGCATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAACGT CTCTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT GTCTTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCC CAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCCAAACCCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACG GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAA
166	Secuencia de nucleótidos de 3C3 L1 (cadena liviana de tipo silvestre de longitud completa) La secuencia que codifica la región constante está subrayada	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTACCATCACTTGTGCGGCGAGTCAGGGTAT TAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCC CCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTAC TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT TACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGG GGACCAAGCTGGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGT CTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC GCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG CCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA CTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACGACACC TACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT

		GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
167	Secuencia de nucleótidos de 3C3 L2 (cadena liviana de tipo silvestre de longitud completa) La secuencia que codifica la región constante está subrayada	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTC CAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGGGTGT TAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCT CCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCA TCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGCCTGGGACAGACTTCAC TCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTAT TACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCACACTTTTGGCCAGGGGA CCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTT <u>CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCC</u> <u>TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA</u> <u>AAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTC</u> <u>CCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC</u> <u>AGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA</u> <u>AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG</u> <u>CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT</u>
168	Secuencia de nucleótidos de 2G6 (VH)	CAGGTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCTT GAGTGACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGACTGGAGTGGGTGACAGTTATCTGGTATGATGGAAGTAATA AATTCTATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATTCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGTTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG AGAGTCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGAC GTCTAGCAACAGGTCACTTCTACTACGTTATGGACGTCTGGGG CCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
169	Secuencia de nucleótidos de 2G6 (VL)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTGCGGGCAGTCAGGGTAT TAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCC CCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTCAAGCGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTAC TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT TACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGG GGACCAAGCTGGAGATCAAA
170	Secuencia de nucleótidos de 2G6 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud completa) La secuencia que codifica la región constante está subrayada	CAGGTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCTT GAGTGACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGACTGGAGTGGGTGACAGTTATCTGGTATGATGGAAGTAATA AATTCTATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATTCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGTTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG AGAGTCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGAC GTCTAGCAACAGGTCACTTCTACTACGTTATGGACGTCTGGGG CCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGC CCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCG AGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGG <u>CACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAAC</u> <u>ACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGCGAGT</u> <u>GCCCACCGTGCCCGAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTT</u> <u>CCTCTTCCCCCCTCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGG</u> <u>ACCCCTGAGGTACGTCGTTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG</u> <u>ACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT</u> <u>GCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGC</u> <u>ACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGTGTGACACAGGACT</u> <u>GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGG</u> <u>CCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGG</u> <u>CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCATCCCCGGG</u> <u>AGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAA</u>

		<u>AGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT</u> <u>GGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGG</u> <u>ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA</u> <u>CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG</u> <u>ATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACGCAGAAGAGCCTCT</u> <u>CCCTGTCTCCGGGTAAA</u>
171	Secuencia de nucleótidos de 2G6 (cadena liviana de tipo silvestre de longitud completa) La secuencia que codifica la región constante está subrayada	<u>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTG</u> <u>TAGGAGACAGAGTACCATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGGGTAT</u> <u>TAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCC</u> <u>CCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGAAAGTGGGG</u> <u>TCCCATCAAGGTTTACGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTAC</u> <u>TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT</u> <u>TACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGG</u> <u>GGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACGTGTGGCTGCACCATCTGT</u> <u>CTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC</u> <u>GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG</u> <u>CCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA</u> <u>CTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC</u> <u>TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG</u> <u>AGAAACACAAAAGTCTACGCCCTGCCAAGTCACCCATCAGGGCCT</u> <u>GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGAGAGTGT</u>
172	Secuencia de nucleótidos de 8A6 (VH)	<u>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG</u> <u>GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCGTCTGGATTACCTT</u> <u>CAGTAGCTATGGCATGCAGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG</u> <u>GGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGAAGGAAGTAATA</u> <u>AATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG</u> <u>AGAAAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG</u> <u>AGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGCGGTC</u> <u>TTATGGTTTCGGGGTCTCTTCTACTACGGTATGGACGTCTGGGG</u> <u>CCAAGGGACCACGGTCAC CGTCTCCTCA</u>
173	Secuencia de nucleótidos de 8A6 (VL)	<u>GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG</u> <u>TAGGAGACAGAGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCAT</u> <u>TAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCT</u> <u>CCTAAGTTCCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGAAAGTGGGG</u> <u>TCCCATCAAGGTTTACGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTAC</u> <u>TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT</u> <u>TACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGG</u> <u>GGACCAAGCTGGAGATCAAA</u>
174	Secuencia de nucleótidos de 8A6 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud completa) La secuencia que codifica la región constante está subrayada	<u>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG</u> <u>GGAGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCGTCTGGATTACCTT</u> <u>CAGTAGCTATGGCATGCAGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG</u> <u>GGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGAAGGAAGTAATA</u> <u>AATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG</u> <u>AGAAAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG</u> <u>AGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGCGGTC</u> <u>TTATGGTTTCGGGGTCTCTTCTACTACGGTATGGACGTCTGGGG</u> <u>CCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGC</u> <u>CCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCG</u> <u>AGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC</u> <u>CGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGC</u> <u>GGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCCTACAGTCCCTCAGGACTCT</u> <u>ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGG</u> <u>CACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAAC</u> <u>ACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGAGT</u> <u>GCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTT</u> <u>CCTCTTCCCCCCTTCAAGGACACCCTCATGATCTCCCCG</u> <u>ACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAG</u> <u>ACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGCGGTGGAGGT</u> <u>GCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGC</u>

		ACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTTGTGCACCAGGACT GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGG CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAA
175	Secuencia de nucleótidos de 8A6 (cadena liviana de tipo silvestre de longitud completa) La secuencia que codifica la región constante está subrayada	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCAT TAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCT CCTAAGTTCCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTAC TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT TACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGG GGACCAAGCTGGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGT CTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGT GCCTCTGTTGTGTGCCTGTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG CCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA CTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
176	Secuencia de nucleótidos de 9G7 (VH)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTAAAGCCTG GGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTT CAGTACCGTCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTGGCCGTATTAAAAGCAAACTGATGGTG GGACAACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTACCAT CTCAAGAGATGATTCAAAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC AGCCTGCACACCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACCACAG GGCAGCTGATCCCTTACTCCTACTACTACGGTATGGACGTCTG GGGCCAAGGGACCTCGGT CACCGTCTCCTCA
177	Secuencia de nucleótidos de 9G7 (VL1)	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTC CAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT TAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAG GCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTG GCATCCCAGACAGGTTGAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTG TATTACTGTGAGCAGTATGGTAGCTCACCGTGGACGTTTCGGCC AAGGGACCAAGGTGGAATCAAA
178	Secuencia de nucleótidos de 9G7 (VL2)	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTC CAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT TACCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAG GCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTG GCATCCCAGAGAGGTTGAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTG TATTACTGTGAGCAGTATGGTAGCTCACCGATCACCTTCGGCC AAGGGACACGACTGGAGATTAAA
179	Secuencia de nucleótidos de 9G7 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud completa) La secuencia que codifica la región constante está	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTAAAGCCTG GGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTT CAGTACCGTCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTGGCCGTATTAAAAGCAAACTGATGGTG GGACAACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTACCAT CTCAAGAGATGATTCAAAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC AGCCTGCACACCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACCACAG

	subrayada	GGCAGCTGATCCCTTACTCCTACTACTACGGTATGGACGTCTG GGGCCAAGGGACCTCGGTACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAG GGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCT CCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGACACACTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT GGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCC CATGCCCATCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATC AGTCTTCCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC AGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTC AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC AGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGGCTCCCGTCCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC AAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCTGCCCCCAT CCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCCG TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA
180	Secuencia de nucleótidos de 9G7 L2 (cadena liviana de tipo silvestre de longitud completa) La secuencia que codifica la región constante está subrayada	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTC CAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT TACCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAG GCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTG GCATCCCAGAGAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTG TATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGATCACCTTCGGCC AAGGGACACGACTGGAGATTAAACGAACGTGTGGCTGCACCATC TGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG TAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
181	Secuencia de nucleótidos de 9G7 L1 (cadena liviana de tipo silvestre de longitud completa) La secuencia que codifica la región constante está subrayada	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTC CAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT TAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAG GCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTG GCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTG TATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGTGGACGTTTCGGCC AAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGAACGTGTGGCTGCACCATC TGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG TAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
182	Secuencia de nucleótidos de 14E3 (VH)	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCTT CAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGATTGGAGAAATCAATCATAGTGGAACACCT

		ACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGCGTCACCATATCAGTAGA CACGTCCAAGAACCAGTTATCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACC GCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATTTGGGAGTA ATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGT CTCTTCA
183	Secuencia de nucleótidos de 14E3 (VL)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTGCGGCGAGTCAGGGTAT TAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCC CCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTTCAAGCGGAGTGGATCTGGGACAGATTTTAC TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT TACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCTCCGACGTTTCGGCCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAAA
184	Secuencia de nucleótidos de 14E3 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud completa) La secuencia que codifica la región constante está subrayada	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCTT CAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGATTGGAGAAATCAATCATAGTGGAACACCT ACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGCGTCACCATATCAGTAGA CACGTCCAAGAACCAGTTATCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACC GCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATTTGGGAGTA ATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGT CTCTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG GAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT GTCTTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCC CAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACG GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAA
185	Secuencia de nucleótidos de 14E3 (cadena liviana de tipo silvestre de longitud completa) La secuencia que codifica la región constante está subrayada	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTGCGGCGAGTCAGGGTAT TAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCC CCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTTCAAGCGGAGTGGATCTGGGACAGATTTTAC TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT TACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCTCCGACGTTTCGGCCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGT CTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC GCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG CCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA CTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACGACACC TACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT

		GAGCTCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
186	Secuencia de nucleótidos de 19H8 (VH)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACACCTT CAGTAACATATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGGCTGGAGTGGATGGCAGTTATATGGTATGGTGGAAAGTAATA AATTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACTCGCTGTCTCTGCAAATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGG CTATGGTTTCGGGGAGTCTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGG CCAAGGGACCACGGTCAC CGTCTCCTCA
187	Secuencia de nucleótidos de 19H8 (VL1)	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCAT TAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCT CCTAAGTTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTAC TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT TACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCTCAGACGTTTCGGCCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAAA
188	Secuencia de nucleótidos de 19H8 (VL2)	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTC CAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT TAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCT CCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCA TCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAC TCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGAGTTTAT TACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCGCTCACTTTCGGCGGAG GGACCAAGGTGGAGATCAAA
189	Secuencia de nucleótidos de 19H8 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud completa) La secuencia que codifica la región constante está subrayada	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACACCTT CAGTAACATATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGGCTGGAGTGGATGGCAGTTATATGGTATGGTGGAAAGTAATA AATTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACTCGCTGTCTCTGCAAATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGG CTATGGTTTCGGGGAGTCTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGG CCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGC CCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCG AGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAACCAGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGG CACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGAGT GCCCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCCTAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGC ACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTTGTGCACCAGGACT GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGG CCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC GTTGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAA

190	Secuencia de nucleótidos de 19H8 L1 (cadena liviana de tipo silvestre de longitud completa) La secuencia que codifica la región constante está subrayada	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCAT TAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCT CCTAAGTTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGAAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTAC TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT TACTGTCAACAGTTTAAATAGTTACCCTCAGACGTTTCGGCCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGT <u>CTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGT</u> <u>GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG</u> <u>CCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA</u> <u>CTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC</u> <u>TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG</u> <u>AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT</u> <u>GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT</u>
191	Secuencia de nucleótidos de 19H8 L2 (cadena liviana de tipo silvestre de longitud completa) La secuencia que codifica la región constante está subrayada	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTC CAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT TAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCT CCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCA TCCCAGCCAGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAC TCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTAT TACTGTGACGAGCGTAGCAACTGGCCGCTCACTTTTCGGCGGAG GGACCAAGGTGGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGT <u>CTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGT</u> <u>GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG</u> <u>CCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA</u> <u>CTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC</u> <u>TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG</u> <u>AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT</u> <u>GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT</u>
192	VH 3-33 (28F3, 18E10, 19D3, 2G6, 8A6, 19H8)	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTTFSSYGMHWRQAPGK GLEWVAVIWDGNSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAR
193	VH 3-10 (28F3, 8A6)	MVRG
194	VH 3-10 (9G7)	YYYG
195	VH 3-10 (19H8)	YYY
196	VH JH6 (28F3, 19H8)	YYYGMDVWGQGTITVTVSS
197	VH JH6 (18E10, 2G6, 8A6)	YYGMDVWGQGTITVTVSS
198	VH JH6 (19D3, 9G7)	YYYYYGMDVWGQGTITVTVSS
199	VH 6-19 (18E10)	IAVA
200	VH 3-16 (19D3)	DY
201	VH 4-34 (3C3, 14E3)	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGK GLEWIGEINHSNSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCAR
202	VH JH3 (3C3, 14E3)	DAFDIWGQGTMTVTVSS
203	VH 3-15 (9G7)	EVQLVESGGGLVKPGSLRLSCAASGFTTFSSAWMSWRQAPGK GLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLKTEDTAVYYCTT
204	VL L18 (28F3, 8A6, 19H8VK1)	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKA PKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQFNNTY
205	VL JK2 (28F3, 18E10, 19D3, 3C3VK1, 8A6, 2G6)	YTFGQGTKLEIK
206	VL JK2 (3C3VK2)	TFGQGTKLEIK
207	VL L15 (18E10, 19D3, 3C3VK1, 2G6, 14E3)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQYNSY

208	VL L20 (3C3VK2)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWYQQKPGQA PRLIIYDASNRATGIPARFSGSGPGTDFTLTISSELEPEDFAVY YCQQRSNW
209	VL A27 (9G7VK1, 9G7VK2)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLIIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSS
210	VL JK1 (9G7VK1)	WTFGGGTKVEIK
211	VL JK1 (14E3, 19H8VK1)	TFGGGTKVEIK
212	VL JK5 (9G7VK2)	ITFGGQTRLEIK
213	VL L6 (19H8VK2)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLIIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVY YCQQRSNW
214	VL JK4 (19H8VK2)	LTFGGGTKEIK
215	Epítipo de G1TR	QRPTGGPGCGPGRLLLTGTGDARCCRVHTTRCCRDYPGE
216	Epítipo de G1TR	QRPTGGPGCGPGRLLLTGTGT
217	Epítipo de G1TR (región 1)	PTGGPGCGPGRLLLTGTGT
218	Epítipo de G1TR (región 2)	CRDYPGEE
219	Ligador peptídico	PVGVV
220	Terminales C de la cadena pesada	LSPGK
221	Región constante de G2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWSNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
222	Región constante de G2(C219S)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWSNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTKVERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
223	Región constante modificada de G2.g1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWSNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
224	Región constante modificada de G2.g1.1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWSNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
225	Región constante modificada de G2(C219S).g1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWSNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTKVERKSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT

		ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
226	Región constante modificada de G2(C219S).g1.1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNV HKPSNTKVDKTVVERKSCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
15	28F3 (VH + G2) o 28F3-IgG2	SEQ ID NO: 15
227	28F3 (VH + G2(C219S)) o 28F3-IgG2-C219S	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAWIWYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSN TKVDKTVVERKSCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TFRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
228	28F3 (VH + G2.g1) o 28F3-IgG2-IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAWIWYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSN TKVDKTVVERKCCVECPPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
229	28F3 (VH + G2.g1.1) o 28F3-IgG2-IgG1.1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAWIWYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSN TKVDKTVVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
230	28F3 (VH + G2(C219S).g1) o 28F3-IgG2-C219S-IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAWIWYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSN TKVDKTVVERKSCVECPPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
231	28F3 (VH +	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK

	G2(C219S).g1.1) o 28F3-IgG2-C219S-IgG1.1	GLEWVAVIWIYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGSMVRGDY YYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSNFGTQT YTCNV D HKPSN TKVDKTVERKSCVECP PCPAPPVAGPSVFLFP PKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
28	19D3 (VH + G2) o 19D3-IgG2	SEQ ID NO: 28
232	19D3 (VH + G2(C219S)) o 19D3-IgG2-C219S	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYG FHWVRQAPGK GLEWVAVIWIYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGQLDY YYYVMDVWGQGT TTVTVSSASTKGP SVVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSNFGTQT YTCNV D HKPSNT KVDKTVERKSCVECP PCPAPPVAGPSVFLFP PKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST FRVVS VLT VVH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV HEALHNHYTQKSLSLSPG
233	19D3 (VH + G2.g1) o 19D3-IgG2-IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYG FHWVRQAPGK GLEWVAVIWIYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGQLDY YYYVMDVWGQGT TTVTVSSASTKGP SVVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSNFGTQT YTCNV D HKPSNT KVDKTVERKCCVECP PCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
234	19D3 (VH + G2.g1.1) o 19D3-IgG2-IgG1.1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYG FHWVRQAPGK GLEWVAVIWIYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGQLDY YYYVMDVWGQGT TTVTVSSASTKGP SVVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSNFGTQT YTCNV D HKPSNT KVDKTVERKCCVECP PCPAPPVAGPSVFLFP PKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV HEALHNHYTQKSLSLSPG
235	19D3 (VH + G2(C219S).g1) o 19D3-IgG2-C219S-IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYG FHWVRQAPGK GLEWVAVIWIYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGQLDY YYYVMDVWGQGT TTVTVSSASTKGP SVVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSNFGTQT YTCNV D HKPSNT KVDKTVERKSCVECP PCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
236	19D3 (VH + G2(C219S).g1.1) o	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYG FHWVRQAPGK GLEWVAVIWIYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL

	19D3-IgG2-C219S-IgG1.1	<u>RAEDTAVYYCARGGQLDYYYYYVMDVWGQGT</u> <u>TVT</u> <u>VSSASTKGP</u> <u>SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>VT</u> <u>SWNSGALTSG</u> <u>VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV</u> <u>PSSNFGTQ</u> <u>TYTCNV</u> <u>DKPSNT</u> <u>KVDKTVERKSCVECP</u> <u>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u> <u>PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG</u> <u>VEVHNAKTKPREEQYNST</u> <u>YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQ</u> <u>PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF</u> <u>YPSDIAVEWESNG</u> <u>QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV</u> <u>HEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
41	18E10 (VH + G2) o 18E10-IgG2	SEQ ID NO: 41
237	18E10 (VH + G2(C219S)) o 18E10-IgG2-C219S	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWRQAPGK</u> <u>GLEWVAWIWYAGSNKYYADSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMN</u> <u>SL</u> <u>RAEDTAVYYCARGGRIAVAFYY</u> <u>SMDVWGQGT</u> <u>TVT</u> <u>VSSASTKGP</u> <u>SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>VT</u> <u>SWNSGALTSG</u> <u>VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV</u> <u>PSSNFGTQ</u> <u>TYTCNV</u> <u>DKPSNT</u> <u>KVDKTVERKSCVECP</u> <u>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u> <u>PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG</u> <u>VEVHNAKTKPREEQFNST</u> <u>FRVVS</u> <u>SVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ</u> <u>PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF</u> <u>YPSDIAVEWESNG</u> <u>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV</u> <u>HEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
238	18E10 (VH + G2.g1) o 18E10-IgG2-IgG1	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWRQAPGK</u> <u>GLEWVAWIWYAGSNKYYADSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMN</u> <u>SL</u> <u>RAEDTAVYYCARGGRIAVAFYY</u> <u>SMDVWGQGT</u> <u>TVT</u> <u>VSSASTKGP</u> <u>SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>VT</u> <u>SWNSGALTSG</u> <u>VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV</u> <u>PSSNFGTQ</u> <u>TYTCNV</u> <u>DKPSNT</u> <u>KVDKTVERKCCVECP</u> <u>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR</u> <u>TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG</u> <u>VEVHNAKTKPREEQYNS</u> <u>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG</u> <u>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF</u> <u>YPSDIAVEWESN</u> <u>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
239	18E10 (VH + G2.g1.1) o 18E10-IgG2-IgG1.1	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWRQAPGK</u> <u>GLEWVAWIWYAGSNKYYADSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMN</u> <u>SL</u> <u>RAEDTAVYYCARGGRIAVAFYY</u> <u>SMDVWGQGT</u> <u>TVT</u> <u>VSSASTKGP</u> <u>SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>VT</u> <u>SWNSGALTSG</u> <u>VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV</u> <u>PSSNFGTQ</u> <u>TYTCNV</u> <u>DKPSNT</u> <u>KVDKTVERKCCVECP</u> <u>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u> <u>PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG</u> <u>VEVHNAKTKPREEQYNST</u> <u>YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQ</u> <u>PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF</u> <u>YPSDIAVEWESNG</u> <u>QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV</u> <u>HEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
240	18E10 (VH + G2(C219S).g1) o 18E10-IgG2-C219S-IgG1	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWRQAPGK</u> <u>GLEWVAWIWYAGSNKYYADSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMN</u> <u>SL</u> <u>RAEDTAVYYCARGGRIAVAFYY</u> <u>SMDVWGQGT</u> <u>TVT</u> <u>VSSASTKGP</u> <u>SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>VT</u> <u>SWNSGALTSG</u> <u>VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV</u> <u>PSSNFGTQ</u> <u>TYTCNV</u> <u>DKPSNT</u> <u>KVDKTVERKSCVECP</u> <u>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR</u> <u>TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG</u> <u>VEVHNAKTKPREEQYNS</u> <u>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG</u> <u>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF</u> <u>YPSDIAVEWESN</u> <u>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
241	18E10 (VH + G2(C219S).g1.1) o 18E10-IgG2-C219S-IgG1.1	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWRQAPGK</u> <u>GLEWVAWIWYAGSNKYYADSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMN</u> <u>SL</u> <u>RAEDTAVYYCARGGRIAVAFYY</u> <u>SMDVWGQGT</u> <u>TVT</u> <u>VSSASTKGP</u>

		<u>SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG</u> <u>VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNT</u> <u>KVDKTVVERKSCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u> <u>PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST</u> <u>YRVVSVLTVHLQDNLGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQ</u> <u>PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG</u> <u>QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM</u> <u>HEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
242	3C3 (VH + G2) o 3C3-IgG2	<u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWTWIRQPPGK</u> <u>GLEWIGKINHSGNTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT</u> <u>AADTAVYYCARLGAFDAFDIWGQGTMTVTSSASTKGPSVFPLA</u> <u>PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA</u> <u>VLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV</u> <u>ERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV</u> <u>VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSV</u> <u>LTVVHQDNLGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV</u> <u>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY</u> <u>KTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN</u> <u>HYTQKSLSLSPG</u>
243	3C3 (VH + G2(C219S)) o 3C3-IgG2-C219S	<u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWTWIRQPPGK</u> <u>GLEWIGKINHSGNTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT</u> <u>AADTAVYYCARLGAFDAFDIWGQGTMTVTSSASTKGPSVFPLA</u> <u>PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA</u> <u>VLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV</u> <u>ERKSCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV</u> <u>VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSV</u> <u>LTVVHQDNLGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV</u> <u>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY</u> <u>KTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN</u> <u>HYTQKSLSLSPG</u>
244	3C3 (VH + G2.g1) o 3C3-IgG2-IgG1	<u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWTWIRQPPGK</u> <u>GLEWIGKINHSGNTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT</u> <u>AADTAVYYCARLGAFDAFDIWGQGTMTVTSSASTKGPSVFPLA</u> <u>PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA</u> <u>VLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV</u> <u>ERKCCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC</u> <u>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS</u> <u>YLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ</u> <u>VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN</u> <u>YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH</u> <u>NHYTQKSLSLSPG</u>
245	3C3 (VH + G2.g1.1) o 3C3-IgG2-IgG1.1	<u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWTWIRQPPGK</u> <u>GLEWIGKINHSGNTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT</u> <u>AADTAVYYCARLGAFDAFDIWGQGTMTVTSSASTKGPSVFPLA</u> <u>PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA</u> <u>VLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV</u> <u>ERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV</u> <u>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS</u> <u>YLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQ</u> <u>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY</u> <u>KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN</u> <u>HYTQKSLSLSPG</u>
246	3C3 (VH + G2(C219S).g1) o 3C3-IgG2-C219S-IgG1	<u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWTWIRQPPGK</u> <u>GLEWIGKINHSGNTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT</u> <u>AADTAVYYCARLGAFDAFDIWGQGTMTVTSSASTKGPSVFPLA</u> <u>PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA</u> <u>VLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV</u> <u>ERKSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC</u>

		<u>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS</u> <u>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ</u> <u>VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN</u> <u>YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH</u> <u>NHYTQKSLSLSPG</u>
247	3C3 (VH + G2(C219S).g1.1) o 3C3-IgG2-C219S-IgG1.1	<u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSGFYWTWIRQPPGK</u> <u>GLEWIGKINHSGNTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT</u> <u>AADTAVYYCARLGAFAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLA</u> <u>PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA</u> <u>VLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV</u> <u>ERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV</u> <u>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS</u> <u>LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQV</u> <u>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY</u> <u>KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN</u> <u>HYTQKSLSLSPG</u>
248	2G6 (VH + G2) o 2G6-IgG2	<u>QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFIILSDYGMHWVRQAPGK</u> <u>GLEWVTVIWYDGSNKFYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL</u> <u>RVEDTAVYYCARGRLATGHFYVMDVWGQGTITVTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSN</u> <u>TKVDKTVVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR</u> <u>TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS</u> <u>TFRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG</u> <u>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN</u> <u>GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
249	2G6 (VH + G2(C219S)) o 2G6-IgG2-C219S	<u>QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFIILSDYGMHWVRQAPGK</u> <u>GLEWVTVIWYDGSNKFYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL</u> <u>RVEDTAVYYCARGRLATGHFYVMDVWGQGTITVTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSN</u> <u>TKVDKTVVERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR</u> <u>TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS</u> <u>TFRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG</u> <u>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN</u> <u>GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
250	2G6 (VH + G2.g1) o 2G6-IgG2-IgG1	<u>QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFIILSDYGMHWVRQAPGK</u> <u>GLEWVTVIWYDGSNKFYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL</u> <u>RVEDTAVYYCARGRLATGHFYVMDVWGQGTITVTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSN</u> <u>TKVDKTVVERKCCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS</u> <u>RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN</u> <u>STYRVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK</u> <u>GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES</u> <u>NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
251	2G6 (VH + G2.g1.1) o 2G6-IgG2-IgG1.1	<u>QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFIILSDYGMHWVRQAPGK</u> <u>GLEWVTVIWYDGSNKFYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL</u> <u>RVEDTAVYYCARGRLATGHFYVMDVWGQGTITVTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSN</u> <u>TKVDKTVVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR</u> <u>TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS</u> <u>TYRVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKG</u> <u>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN</u>

		<u>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
252	2G6 (VH + G2(C219S).g1) o 2G6-IgG2-C219S-IgG1	<u>QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFI</u> <u>LDYGMHWVRQAPGK</u> <u>GLEWVTVI</u> <u>WYDGSNKFYVDSVKGRFTISR</u> <u>DNSKNTLYLQMN</u> <u>SL</u> <u>RVEDTAVYYC</u> <u>ARGRLATGHFYVMDVWGQGT</u> <u>TVTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPCSRSTSE</u> <u>STAALGCLVKDYFPEP</u> <u>VTVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</u> <u>TVPSSNFGTQTY</u> <u>TCNV</u> <u>DHKPSN</u> <u>TKVDKTV</u> <u>VERKSCVECP</u> <u>PCPAPELLGGPSVFLF</u> <u>PPKPKDTLMIS</u> <u>RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG</u> <u>VEVHNAKTKPREEQYN</u> <u>STYRVVSVLT</u> <u>VLHQDLNGKEYKCKVSNKALP</u> <u>APIEKTISKAK</u> <u>GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYP</u> <u>PSDIAVEWES</u> <u>NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV</u> <u>DKSRWQQGNVFSCSV</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
253	2G6 (VH + G2(C219S).g1.1) o 2G6-IgG2-C219S-IgG1.1	<u>QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFI</u> <u>LDYGMHWVRQAPGK</u> <u>GLEWVTVI</u> <u>WYDGSNKFYVDSVKGRFTISR</u> <u>DNSKNTLYLQMN</u> <u>SL</u> <u>RVEDTAVYYC</u> <u>ARGRLATGHFYVMDVWGQGT</u> <u>TVTVTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPCSRSTSE</u> <u>STAALGCLVKDYFPEP</u> <u>VTVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</u> <u>TVPSSNFGTQTY</u> <u>TCNV</u> <u>DHKPSN</u> <u>TKVDKTV</u> <u>VERKSCVECP</u> <u>PCPAPPVAGPSVFLF</u> <u>PPKPKDTLMISR</u> <u>TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG</u> <u>VEVHNAKTKPREEQYNS</u> <u>TYRVVSVLT</u> <u>VLHQDLNGKEYKCKVSNKALP</u> <u>SSIEKTISKAKG</u> <u>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYP</u> <u>PSDIAVEWESN</u> <u>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV</u> <u>DKSRWQQGNVFSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
86	8A6 (VH + G2) o 8A6-IgG2	SEQ ID NO: 86
254	8A6 (VH + G2(C219S)) o 8A6-IgG2-C219S	<u>QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCTASGFTF</u> <u>SSYGMQWVRQAPGK</u> <u>GLEWVAVI</u> <u>WYEGSNKYYADSVKGRFTISR</u> <u>ENSKNTLYLQMN</u> <u>SL</u> <u>RAEDTAVYYC</u> <u>ARGGLMVRGLFYYGMDVWGQGT</u> <u>TVTVTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPCSRSTSE</u> <u>STAALGCLVKDYFPEP</u> <u>VTVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</u> <u>TVPSSNFGTQTY</u> <u>TCNV</u> <u>DHKPSN</u> <u>TKVDKTV</u> <u>VERKSCVECP</u> <u>PCPAPPVAGPSVFLF</u> <u>PPKPKDTLMISR</u> <u>TPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDG</u> <u>VEVHNAKTKPREEQFNS</u> <u>TFRVSVLT</u> <u>TVVHQDLNGKEYKCKVSNKGLP</u> <u>APIEKTISKTKG</u> <u>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYP</u> <u>PSDIAVEWESN</u> <u>GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTV</u> <u>DKSRWQQGNVFSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
255	8A6 (VH + G2.g1) o 8A6 -IgG2-IgG1	<u>QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCTASGFTF</u> <u>SSYGMQWVRQAPGK</u> <u>GLEWVAVI</u> <u>WYEGSNKYYADSVKGRFTISR</u> <u>ENSKNTLYLQMN</u> <u>SL</u> <u>RAEDTAVYYC</u> <u>ARGGLMVRGLFYYGMDVWGQGT</u> <u>TVTVTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPCSRSTSE</u> <u>STAALGCLVKDYFPEP</u> <u>VTVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</u> <u>TVPSSNFGTQTY</u> <u>TCNV</u> <u>DHKPSN</u> <u>TKVDKTV</u> <u>VERKCCVECP</u> <u>PCPAPELLGGPSVFLF</u> <u>PPKPKDTLMIS</u> <u>RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG</u> <u>VEVHNAKTKPREEQYN</u> <u>STYRVVSVLT</u> <u>VLHQDLNGKEYKCKVSNKALP</u> <u>APIEKTISKAK</u> <u>GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYP</u> <u>PSDIAVEWES</u> <u>NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV</u> <u>DKSRWQQGNVFSCSV</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
256	8A6 (VH + G2.g1.1) o 8A6 -IgG2-IgG1.1	<u>QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCTASGFTF</u> <u>SSYGMQWVRQAPGK</u> <u>GLEWVAVI</u> <u>WYEGSNKYYADSVKGRFTISR</u> <u>ENSKNTLYLQMN</u> <u>SL</u> <u>RAEDTAVYYC</u> <u>ARGGLMVRGLFYYGMDVWGQGT</u> <u>TVTVTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPCSRSTSE</u> <u>STAALGCLVKDYFPEP</u> <u>VTVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</u> <u>TVPSSNFGTQTY</u> <u>TCNV</u> <u>DHKPSN</u> <u>TKVDKTV</u> <u>VERKCCVECP</u> <u>PCPAPPVAGPSVFLF</u> <u>PPKPKDTLMISR</u> <u>TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG</u> <u>VEVHNAKTKPREEQYNS</u> <u>TYRVVSVLT</u> <u>VLHQDLNGKEYKCKVSNKALP</u> <u>SSIEKTISKAKG</u> <u>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYP</u> <u>PSDIAVEWESN</u> <u>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV</u> <u>DKSRWQQGNVFSCSV</u>

		MHEALHNHYTQKSLSLSPG
257	8A6 (VH + G2(C219S).g1) o 8A6-IgG2-C219S-IgG1	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYGMQWVRQAPGK</u> <u>GLEWVAVIWYEGSNKYYADSVKGRFTISRENSKNTLYLQMNSL</u> <u>RAEDTAVYYCARGGLMVRGLFYYGMDVWGQGT'TVTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSN</u> <u>TKVDKTVERKSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS</u> <u>RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN</u> <u>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK</u> <u>GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES</u> <u>NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
258	8A6 (VH + G2(C219S).g1.1) o 8A6-IgG2-C219S-IgG1.1	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYGMQWVRQAPGK</u> <u>GLEWVAVIWYEGSNKYYADSVKGRFTISRENSKNTLYLQMNSL</u> <u>RAEDTAVYYCARGGLMVRGLFYYGMDVWGQGT'TVTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSN</u> <u>TKVDKTVERKSCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR</u> <u>TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS</u> <u>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKG</u> <u>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN</u> <u>GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
259	9G7 (VH + G2) o 9G7-IgG2	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTVWMSWVRQAPGK</u> <u>GLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN</u> <u>SLHTEDTAVYYCTTGQLIPYSYYYGMDVWGQGT'SVTVSSASTK</u> <u>GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT</u> <u>SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPS</u> <u>NTKVDKTVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS</u> <u>RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN</u> <u>STFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK</u> <u>GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES</u> <u>NGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
260	9G7 (VH + G2(C219S)) o 9G7-IgG2-C219S	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTVWMSWVRQAPGK</u> <u>GLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN</u> <u>SLHTEDTAVYYCTTGQLIPYSYYYGMDVWGQGT'SVTVSSASTK</u> <u>GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT</u> <u>SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPS</u> <u>NTKVDKTVERKSCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS</u> <u>RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN</u> <u>STFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK</u> <u>GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES</u> <u>NGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
261	9G7 (VH + G2.g1) o 9G7-IgG2-IgG1	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTVWMSWVRQAPGK</u> <u>GLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN</u> <u>SLHTEDTAVYYCTTGQLIPYSYYYGMDVWGQGT'SVTVSSASTK</u> <u>GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT</u> <u>SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPS</u> <u>NTKVDKTVERKCCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI</u> <u>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY</u> <u>NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</u> <u>KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE</u> <u>SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC</u> <u>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
262	9G7 (VH + G2.g1.1) o 9G7-IgG2-IgG1.1	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTVWMSWVRQAPGK</u> <u>GLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN</u>

		SLHTEDTAVYYCTTGQLIPYSYYYGMDVWGQGTSTVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPS NTKVDKTVVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
263	9G7 (VH + G2(C219S).g1) o 9G7-IgG2-C219S-IgG1	EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTTFSTVWMSWVRQAPGK GLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLHTEDTAVYYCTTGQLIPYSYYYGMDVWGQGTSTVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPS NTKVDKTVVERKSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
264	9G7 (VH + G2(C219S).g1.1) o 9G7-IgG2-C219S-IgG1.1	EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTTFSTVWMSWVRQAPGK GLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLHTEDTAVYYCTTGQLIPYSYYYGMDVWGQGTSTVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPS NTKVDKTVVERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
265	14E3 (VH + G2) o 14E3-IgG2	QVQLQQWAGALLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGK GLEWIGEINHSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQSLKLSSVT AADTAVYYCARFGSNDADFIDWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPMLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG
266	14E3 (VH + G2(C219S)) o 14E3-IgG2-C219S	QVQLQQWAGALLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGK GLEWIGEINHSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQSLKLSSVT AADTAVYYCARFGSNDADFIDWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV ERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPMLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG
267	14E3 (VH + G2.g1) o 14E3-IgG2-IgG1	QVQLQQWAGALLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGK GLEWIGEINHSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQSLKLSSVT AADTAVYYCARFGSNDADFIDWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV

		<u>ERKCCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC</u> <u>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS</u> <u>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ</u> <u>VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN</u> <u>YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH</u> <u>NHYTQKSLSLSPG</u>
268	14E3 (VH + G2.g1.1) o 14E3-IgG2-IgG1.1	<u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGK</u> <u>GLEWIGEINHSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQLSLKLSSVT</u> <u>AADTAVYYCARFGSNDADFIDWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLA</u> <u>PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA</u> <u>VLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV</u> <u>ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV</u> <u>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS</u> <u>LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQV</u> <u>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY</u> <u>KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN</u> <u>HYTQKSLSLSPG</u>
269	14E3 (VH + G2(C219S).g1) o 14E3-IgG2-C219S-IgG1	<u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGK</u> <u>GLEWIGEINHSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQLSLKLSSVT</u> <u>AADTAVYYCARFGSNDADFIDWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLA</u> <u>PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA</u> <u>VLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV</u> <u>ERKSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC</u> <u>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS</u> <u>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ</u> <u>VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN</u> <u>YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH</u> <u>NHYTQKSLSLSPG</u>
270	14E3 (VH + G2(C219S).g1.1) o 14E3-IgG2-C219S-IgG1.1	<u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGK</u> <u>GLEWIGEINHSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQLSLKLSSVT</u> <u>AADTAVYYCARFGSNDADFIDWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLA</u> <u>PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA</u> <u>VLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV</u> <u>ERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV</u> <u>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS</u> <u>LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQV</u> <u>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY</u> <u>KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN</u> <u>HYTQKSLSLSPG</u>
131	19H8 (VH + G2) o 19H8-IgG2	SEQ ID NO: 131
271	19H8 (VH + G2(C219S)) o 19H8-IgG2-C219S	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGK</u> <u>GLEWMAVIWYGGSNKFYADSVKGRFTISRDNKNSLSLQMNSL</u> <u>RAEDTAVYYCARGGAMVRGVYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSN</u> <u>TKVDKTVVERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR</u> <u>TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS</u> <u>TFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG</u> <u>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN</u> <u>GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
272	19H8 (VH + G2.g1) o 19H8-IgG2-IgG1	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGK</u> <u>GLEWMAVIWYGGSNKFYADSVKGRFTISRDNKNSLSLQMNSL</u> <u>RAEDTAVYYCARGGAMVRGVYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSN</u> <u>TKVDKTVVERKCCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS</u>

		<u>RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN</u> <u>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK</u> <u>GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES</u> <u>NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
273	19H8 (VH + G2.g1.1) o 19H8-IgG2-IgG1.1	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGK</u> <u>GLEWMAVIWYGGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNSLSLQMNSL</u> <u>RAEDTAVYYCARGGAMVRGVYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSN</u> <u>TKVDKTV ERKCCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR</u> <u>TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS</u> <u>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKG</u> <u>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN</u> <u>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
274	19H8 (VH + G2(C219S).g1) o 19H8-IgG2-C219S-IgG1	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGK</u> <u>GLEWMAVIWYGGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNSLSLQMNSL</u> <u>RAEDTAVYYCARGGAMVRGVYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSN</u> <u>TKVDKTV ERKSCVECP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR</u> <u>RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN</u> <u>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK</u> <u>GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES</u> <u>NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
275	19H8 (VH + G2(C219S).g1.1) o 19H8-IgG2-C219S-IgG1.1	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGK</u> <u>GLEWMAVIWYGGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNSLSLQMNSL</u> <u>RAEDTAVYYCARGGAMVRGVYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSN</u> <u>TKVDKTV ERKSCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR</u> <u>TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS</u> <u>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKG</u> <u>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN</u> <u>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
276	Terminales C de la cadena pesada	LSPG
277	-	
278	CH1 de IgG1 humana de tipo silvestre	<u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS</u> <u>GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN</u> <u>HKPSN TKVDKKV</u>
279	CH1 de IgG2 humana de tipo silvestre	<u>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS</u> <u>GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNV D</u> <u>HKPSN TKVDKTV</u>
280	CH2 de IgG1 humana de tipo silvestre	<u>PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV</u> <u>SNKALPAPIEKTISKAK</u>
281	CH2 de IgG1 humana con A330S/P331S	<u>PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV</u> <u>SNKALPSSIEKTISKAK</u>
282	CH3 de IgG1 humana de tipo silvestre	<u>GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES</u> <u>NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
283	IgG1-IgG2-IgG1f	<u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS</u>

		GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVERKCCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
284	IgG1-IgG2CS-IgG1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVERKSCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
285	IgG1-IgG2-IgG1.1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
286	IgG1-IgG2CS-IgG1.1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVERKSCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
287	IgG1-IgG2-1gG1f2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
288	IgG1-IgG2(C219S)-IgG1f2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVERKSCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
289	IgG2-IgG1f2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
290	IgG2(C219S)-IgG1f2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDT

		LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
291	Bisagra de IgG2 humana WT	ERKCCVECPPCPAPPVAG
292	Bisagra de IgG2 humana con C219S	ERKSCVECPPCPAPPVAG
293	Bisagra de IgG2/IgG1	ERKCCVECPPCPAPELLGG
294	Bisagra de IgG2 (C219S)/IgG1	ERKSCVECPPCPAPELLGG
295	Bisagra de IgG1 humana de tipo silvestre	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
296	Bisagra de IgG1.1 (L234A/L235E/G237A)	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGA
297	CH2 de IgG2 humana de tipo silvestre	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPAPIEKTIISKTK
298	CH3 de IgG2 humana de tipo silvestre	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
299	Terminal C C _H 1 de IgG1 (igual para IgG3 (17-15-15-15), IgG3 (17-15-15), IgG3 (17-15), IgG3 (15-15-15), IgG3 (15) e IgG4	VDKRV
300	Terminal C C _H 1 de IgG2	VDKTV
301	Bisagra superior de IgG1	EPKSCDKTHT
302	Bisagra superior de IgG3 (17-15-15-15) (igual para IgG3 (17-15-15) e IgG3 (17-15))	ELKTPLGDTTHT
303	Bisagra superior de IgG3 (15-15-15) (igual para IgG3(15))	EPKS
304	Bisagra superior de IgG4	ESKYGPP
305	Bisagra intermedia de IgG1	CPPCP
306	Bisagra intermedia de IgG2	CCVECPPCP
307	Bisagra intermedia de IgG3 (17-15-15-15)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₃
308	Bisagra intermedia de IgG3 (17-15-15)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₂
309	Bisagra intermedia de IgG3 (17-15)	CPRCPEPKSCDTPPPCPRCP
310	Bisagra intermedia de IgG3 (15-15-15)	CDTPPPCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₂
311	Bisagra intermedia de IgG3 (15)	CDTPPPCPRCP
312	Bisagra intermedia de IgG4	CPSCP
313	Bisagra inferior de IgG1 (igual para IgG3 (17-15-15-	APELLGG

	15), IgG3 (17-15-15), IgG3 (17-15), IgG3 (15-15-15), IgG3 (15) e IgG4)	
314	Bisagra inferior de IgG2	APPVAG
315	Secuencia de señal VH de 28F3 (igual para 18E10, 19D3, 19H8, 6G10)	MEFGLSWVFLVALLRGVQC
316	Secuencia de señal VH de 28F3 (secuencia de nucleótidos)	ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAA GAGGTGTCCAGTGT
317	Secuencia de señal VL de 28F3 (igual para 18E10, 8A6, 19H8VL1, 6G10)	MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC
318	Secuencia de señal VL de 28F3 (secuencia de nucleótidos)	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGC TCTGGCTCCCAGGTGCCAGAT
319	Secuencia de señal VL de 19D3	MRVLAQLLGLLLLCFPGARC
320	Secuencia de señal VL de 19D3 (secuencia de nucleótidos)	ATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTT TCCCAGGTGCCAGATGT
321	Secuencia de señal VH de 3C3 (igual para 14E3)	MKHLWFFLLLVAAPRWLS
322	Secuencia de señal VH de 3C3 (secuencia de nucleótidos)	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCA GATGGGTCTCTGTCC
323	Secuencia de señal VL de 3C3 (igual para 14E3)	MDMRVLAQLLGLLLLCFPGARC
324	Secuencia de señal VL de 3C3 (secuencia de nucleótidos)	ATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGC TCTGTTTCCCAGGTGCCAGATGT
325	Secuencia de señal VL2 de 3C3 (igual para 19H8 VL2)	MEAPAQLLFLLLLWLPD TTG
326	Secuencia de señal VL2 de 3C3 (secuencia de nucleótidos)	ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGC TCCCAGATACCACCGGA
327	Secuencia de señal VH de 8A6	MEFGLNWVFLVALLRGVQC
328	Secuencia de señal VH de 8A6 (secuencia de nucleótidos)	ATGGAGTTTGGGCTGAACTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAA GAGGTGTCCAGTGT
329	Secuencia de señal VH de 9G7	MEFGLSWIFLAAILKGVQC
330	Secuencia de señal VH de 9G7 (secuencia de nucleótidos)	ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGATTTTCTTGCTGCTATTTTAA AAGGTGTCCAGTGT
331	Secuencia de señal VL1 y VL2 de 9G7	METPAQLLFLLLLWLPD TTG
332	Secuencia de señal VL1 y VL2 de 9G7 (secuencia de nucleótidos)	ATGGAACCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGC TCCCAGATACCACCGGA

333	Secuencia de señal VH de 14E3	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS
334	Secuencia de señal VH de 14E3 (secuencia de nucleótidos)	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCA GATGGGTCCTGTCC
335	6G10 (VH)	QVQLVESGGDVVQPGSLRLSCAASGFTTFSTYGMHWVRQAPGK GLEWVAVTWYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGSMVRGLYYYGMDVWGQGT ^T TVTVSS
336	6G10 (VL)	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPGKA PKLLIYDASSLES ^G VP ^S RFSGSGSGTDFTLT ^I SS ^L QPEDFATY YCQQFNSYPYTFGQGTKLEIK
337	6G10 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud completa) La región constante está subrayada	QVQLVESGGDVVQPGSLRLSCAASGFTTFSTYGMHWVRQAPGK GLEWVAVTWYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGSMVRGLYYYGMDVWGQGT ^T TVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNV ^D HKPSN TKVDKTV ^E RKCCVECP ^P CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TFRVVS ^V LT ^V VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTT ^P PMLDS ^D GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
338	6G10 (cadena liviana de tipo silvestre de longitud completa) La región constante está subrayada	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPGKA PKLLIYDASSLES ^G VP ^S RFSGSGSGTDFTLT ^I SS ^L QPEDFATY YCQQFNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS ^T YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
339	6G10.IgG1 (VH + IgG1)	QVQLVESGGDVVQPGSLRLSCAASGFTTFSTYGMHWVRQAPGK GLEWVAVTWYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGSMVRGLYYYGMDVWGQGT ^T TVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRV ^E PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTT ^P PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSV ^M MHEALHNHYTQKSLSLSPG
340	6G10.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	QVQLVESGGDVVQPGSLRLSCAASGFTTFSTYGMHWVRQAPGK GLEWVAVTWYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGSMVRGLYYYGMDVWGQGT ^T TVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRV ^E PKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTT ^P PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSV ^M MHEALHNHYTQKSLSLSPG
341	6G10.IgG1 (VL + CL)	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPGKA PKLLIYDASSLES ^G VP ^S RFSGSGSGTDFTLT ^I SS ^L QPEDFATY YCQQFNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS ^T YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

342	6G10 VH CDR1	TYGMH
343	6G10 VH CDR2	VTWYAGSNKFYADSVKG
344	6G10 VH CDR3	GGSMVRGLYYYGMDV
345	6G10 VL CDR1	RASQGISSALA
346	6G10 VL CDR2	DASSLES
347	6G10 VL CDR3	QQFNSYPYT
337	6G10 (VH + G2) o 6G10-IgG2	SEQ ID NO: 337
348	6G10 (VH + G2(C219S)) o 6G10-IgG2-C219S	QVQLVESGGDVVQPGRSRLRLSCAASGFTTFSTYGMHWVRQAPGK GLEWVAVTWYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGSMVRGLYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKTVVERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TFRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
349	6G10 (VH + G2.g1) o 6G10-IgG2-IgG1	QVQLVESGGDVVQPGRSRLRLSCAASGFTTFSTYGMHWVRQAPGK GLEWVAVTWYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGSMVRGLYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKTVVERKCCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
350	6G10 (VH + G2.g1.1) o 6G10-IgG2-IgG1.1	QVQLVESGGDVVQPGRSRLRLSCAASGFTTFSTYGMHWVRQAPGK GLEWVAVTWYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGSMVRGLYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKTVVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
351	6G10 (VH + G2(C219S).g1) o 6G10-IgG2-C219S-IgG1	QVQLVESGGDVVQPGRSRLRLSCAASGFTTFSTYGMHWVRQAPGK GLEWVAVTWYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGSMVRGLYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKTVVERKSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
352	6G10 (VH + G2(C219S).g1.1) o 6G10-IgG2-C219S-IgG1.1	QVQLVESGGDVVQPGRSRLRLSCAASGFTTFSTYGMHWVRQAPGK GLEWVAVTWYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGGSMVRGLYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS

		GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKTV <u>ERKSCVECP</u> PCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIISKAKG QPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
353	Secuencia de nucleótidos de 6G10 (VH)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACGTGGTCCAGCCTG GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTT CAGTACCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTACATGGTATGCTGGAAGTAATA AATTTTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTA GTATGGTTCCGGGACTTTATTATTACGGTATGGACGTCTGGGG CCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
354	Secuencia de nucleótidos de 6G10 (VL)	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCAT TAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCT CCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTAC TCTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT TACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGTACACTTTTGCCAGG GGACCAAGCTGGAGATCAAA
355	Secuencia de nucleótidos de 6G10 (cadena pesada de tipo silvestre de longitud completa) La secuencia que codifica la región constante está subrayada	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACGTGGTCCAGCCTG GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTT CAGTACCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTACATGGTATGCTGGAAGTAATA AATTTTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTA GTATGGTTCCGGGACTTTATTATTACGGTATGGACGTCTGGGG CCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGC CCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCG AGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAAGTTCGG CAGCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCACTAAC ACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGTCGAGT GCCCACCGTGCCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCCTTCCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGC ACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGTGTGACACAGGACT GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGG CCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAA
356	Secuencia de nucleótidos de 6G10 (cadena liviana de tipo	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCAT TAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCT

	silvestre de longitud completa) La secuencia que codifica la región constante está subrayada	CCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTAC TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT TACTGTCAACAGTTTAAATAGTTACCCGTACACTTTTGCCAGG GGACCAAGCTGGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGT CTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG CCAAAGTACAGTGGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA CTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCT GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
357	28F3 (VH) (SEQ ID NO: 13) con péptido de señal El péptido de señal está subrayado	MRWIFFLLCLAGRALAQVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASG FTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWEYSNKKYADSVKGRFT ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYIYGMD VWGQGTITVTVSS
358	28F3 (VL) (SEQ ID NO: 14) con péptido de señal El péptido de señal está subrayado	MRWIFFLLCLAGRALAAIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRAS QGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPYTFGQGTKLEIK
359	Secuencia de nucleótidos de 28F3 (VH) con péptido de señal SEQ ID NO: 147 con secuencia que codifica el péptido de señal La secuencia que codifica el péptido de señal está subrayada	atgagggccttgatcttctttctgctctgctgctggccgggagag cgctcgcaCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGT CCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGA TTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTC CAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGAAGG AAGTAATAAATATTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACC ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGA ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAG AGGGGGGAGTATGGTTTCGGGGGGACTACTACTACGGTATGGAC GTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCCTCA
360	Secuencia de nucleótidos de 28F3 (VL) con péptido de señal SEQ ID NO: 148 con secuencia que codifica el péptido de señal La secuencia que codifica el péptido de señal está subrayada	atgagggccttgatcttctttctgctctgctgctggccggggcgcg ccttgccGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTGCCGGGCAAGT CAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAG GGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGA AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACA GATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTG CAACTTATTACTGTCAACAGTTTAAATAGTTACCCGTACACTTT TGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
361	28F3.IgG1 (VH + IgG1) (SEQ ID NO: 17) con péptido de señal El péptido de señal y la región constante están subrayados	MRWIFFLLCLAGRALAQVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASG FTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWEYSNKKYADSVKGRFT ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYIYGMD VWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGLVKD YFPEPTVTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCKDTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
362	28F3.IgG1.1 (VH + IgG1.1) (SEQ ID NO: 18) con	MRWIFFLLCLAGRALAQVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASG FTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWEYSNKKYADSVKGRFT

	péptido de señal El péptido de señal y la región constante están subrayados	ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYYGMD VWQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTCTPPCPAPEA EGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
363	28F3.IgG1 (VH + IgG1) con secuencia de nucleótidos del péptido de señal SEQ ID NO: 151 con secuencia que codifica el péptido de señal La secuencia que codifica el péptido de señal está subrayada	atgagggccttgatcttctttctgctctgctgcccgggagag cgctcgacaggtgcagctgggtgagctctgggggagggcggtg ccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctgga ttcaccttcagtagctatggcatgcactgggtccgccaggtc caggcaaggggctggagtggtggcagttatatggtatgaagg aagtaataaatattatgcagactccgtgaagggccgattcacc atctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatga acagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgag aggggggagtatggttcggggggactactactacggtatggac gtctggggccaagggaccacgggtcaccgtctcctcagctagca ccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagag cacctctgggggcacagcggccctgggtgctgctggaactcaggac tactccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccc tgaccagcggcgtgcacaccttccccggtgtcctacagtcctc aggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcccctccagc agcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagc ccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaatcttg tgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcactgaactc ctggggggaccgtcagctcttcttccccccaaaacccaagg acaccctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgcgtgggt ggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactgg tacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgc gggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcct caccgtcctgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaag tgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaa ccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgta caccctgcccccatccgggaggagatgaccaagaaccaggtc agcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcg ccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagacaactaca gaccacgcctcccgctgctggactccgacgggtccttcttctc tatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggga acgtcttctcatgctccgtgatgcaggtctgcacaacca ctacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtga
364	28F3.IgG1.1 (VH + IgG1.1) con secuencia de nucleótidos del péptido de señal SEQ ID NO: 152 con secuencia que codifica el péptido de señal La secuencia que codifica el péptido de señal está subrayada	atgagggccttgatcttctttctgctctgctgcccgggagag cgctcgacaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc tctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg aaggaagtaa taaatattat gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagggggg agtatggttc ggggggacta ctactacggt atggacgtc ggggccaagg gaccacggtc accgtctcct cagctagcac caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctcttccaag agcacctctg ggggcacagc ggcctgggc tgctgtgca aggactactt cccgaaccg gtgacgggtg cgtggaactc aggcgcctg accagcgcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtgggtga ccgtgccctc cagcagcttg

		ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag agagttgagc ccaaactctg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa gccgaagggg ccccgctcagt ctctctcttc cccccaaac ccaaggacac cctcatgata tcccggaacc ctgaggtcac atgctgtgtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtgtgc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaagggtc tccaacaaag ccctcccaag cagcatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccagggtc agcctgacct gcctggtcaa aggttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgcctgactc cgacggctcc ttcttctct atagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tccccgggtt ga
365	28F3.IgG1 (VL+CL) (SEQ ID NO: 19) con péptido de señal El péptido de señal y la región constante están subrayados	<u>MRAWIFFLLCLAGRALAAIQLTQSPSSLSASVGRVTITCRAS</u> <u>QGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFGSGSGT</u> <u>DFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSTPYTFGGTKLEIKRTVAA</u> <u>PSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQ</u> <u>SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH</u> <u>QGLSSPVTKSFNRGEC</u>
366	28F3.IgG1 (VL+CL) con secuencia de nucleótidos del péptido de señal SEQ ID NO: 153 con secuencia de señal La secuencia que codifica el péptido de señal está subrayada	atgagggccttgatcttctttctgctctgcctggccgggagcg ccttgccgccatccagttgacctcctcctcctgtc tgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagt cagggcattagcagtgctttagcctggtatcagcagaaaccag ggaaagctcctaagctcctgatctatgatgcctccagtttgga aagtgggggtcccatcaaggttcagcggcagtggtctgtggaca gatttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagattttg caacttattactgtcaacagtttaatagtttaccggtacattt tgccaggggaccaaagctggagatcaaacgtacgggtggctgca ccatctgtcttcactcttcccgccatctgatgagcagttgaaat ctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcc cagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaa tcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaagg acagcacctacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaagc agactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccat cagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggag agtgttag
367	Péptido de señal	MRAWIFFLLCLAGRALA
368	Secuencia de nucleótidos del péptido de señal	atgagggccttgatcttctttctgctctgcctggccgggagag cgctcgca
369	Secuencia de nucleótidos del péptido de señal	atgagggccttgatcttctttctgctctgcctggccgggagcg ccttgccc
370	Fragmento de GTR humano	QRPTGGPGCGPGRLLLTGTGDARCCRVHTTR
371	9G7 L1 (cadena liviana 1 de tipo silvestre de longitud completa) La región constante está subrayada	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSSPWTFGGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSG TASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

372	CDR1 de VH degenerada	SYGXH, en donde X es cualquier aminoácido
373	CDR2 de VH degenerada	VIWYX ₁ GSNKX ₂ YADSVKG, en donde X ₁ y X ₂ son cualquier aminoácido
374	CDR2 de VH degenerada	VIWYX ₁ GSNKX ₂ YX ₃ DSVKG, en donde X ₁ , X ₂ y X ₃ son cualquier aminoácido
375	CDR3 de VH degenerada	GGSX ₁ VRGDYYYGMDV, en donde X ₁ es cualquier aminoácido
376	CDR3 de VH degenerada	GGSX ₁ VRGX ₂ YYYGMDV, en donde X ₁ y X ₂ son cualquier aminoácido
377	CDR3 de VH degenerada	GG (6-7aa) MDVWYYX ₁ MDVW, en donde X ₁ es cualquier aminoácido, y los aminoácidos 6-7 son cualquier aminoácido
378	CDR1 de VL degenerada	RASQGISSXLA, en donde X es cualquier aminoácido
379	CDR1 de VL degenerada	RASQG (2-3 aa) SX ₁ LA, en donde X ₁ es cualquier aminoácido, y los aminoácidos 2-3 son cualquier aminoácido
380	CDR2 de VL degenerada	DASSLXS, en donde X es cualquier aminoácido
381	CDR3 de VL degenerada	QQXNSYPYT, en donde X es cualquier aminoácido
382	CDR3 de VL degenerada	QQX ₁ X ₂ SX ₃ PX ₄ T, en donde X ₁ , X ₂ , X ₃ y X ₄ son cualquier aminoácido

La Tabla 11 proporciona las secuencias de las regiones variables maduras y cadenas pesadas y livianas y, cuando se indica, las secuencias con péptidos de señal.

Equivalentes:

Una persona del oficio de nivel medio reconocerá, o podrá determinar sin usar más que experimentos de rutina, varios equivalentes de las formas de realización específicas descritas en la presente. Los equivalentes están incluidos en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, o porción de fijación al antígeno de este, **caracterizado** porque se fija al receptor de TNF inducible por glucocorticoides (GITR) humano y muestra las siguientes propiedades:
 - (a) se fija al GITR soluble humano;
 - (b) se fija al GITR humano unido a la membrana;
 - (c) se fija a GITR de *Macaca fascicularis* unido a la membrana;
 - (d) induce o mejora la activación de linfocitos T;
 - (e) inhibe la fijación del ligando GITR a GITR en células 3A9-hGITR;
 - (f) inhibe parcialmente, como máximo, la fijación del ligando GITR a GITR en linfocitos T activados;
 - (g) se fija al epítipo conformacional en GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4);
 - (h) se fija a GITR humano no glucosilado y glucosilado ligado a N y ligado a O;
 - (i) tiene actividad agonista en ausencia de la fijación a un receptor Fc, pero en donde la fijación a un receptor Fc también mejora la actividad agonista; y
 - (j) compete en cualquier dirección o en ambas direcciones, para fijarse a GITR humano, con uno o más de los anticuerpos 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 y 6G10.
2. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el anticuerpo estimula una respuesta inmunitaria antitumoral.
3. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado** porque el anticuerpo estimula una respuesta de linfocitos T específicos del antígeno.
4. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el anticuerpo aumenta la producción de IL-2 y/o IFN- γ en linfocitos T que expresan GITR.
5. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el anticuerpo aumenta la proliferación de linfocitos T.
6. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el anticuerpo no se fija a los receptores Fc.
7. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, **caracterizado** porque el anticuerpo se fija a

uno o más FcγR activadores.

8. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el anticuerpo se fija a GITR humano soluble con una K_D de 10 nM o menos, según la medición mediante Biacore.

9. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el anticuerpo se fija a GITR humano unido a la membrana con una K_D de 1 nM o menos, según la medición mediante Scatchard.

10. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el anticuerpo se fija a GITR humano unido a la membrana con un EC_{50} de 1 nM o menos según la medición mediante FACS.

11. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el anticuerpo se fija a GITR de Macaca fascicularis unido a la membrana con un EC_{50} de 10 nM o menos según la medición mediante FACS.

12. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el anticuerpo induce o mejora la activación de linfocitos T sin requerir reticulación multivalente.

13. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el anticuerpo inhibe la fijación del ligando GITR a GITR con un EC_{50} de 1 μg/ml o menos, según medición de FACS.

14. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el anticuerpo se fija a PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) y CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218) de GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4).

15. Un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de fijación al antígeno de este, **caracterizado** porque se fija específicamente al receptor de TNF inducible por glucocorticoides (GITR), y comprende las tres CDR de la cadena pesada variable y las tres CDR de la cadena liviana variable, que se encuentran en los pares de la cadena pesada variable y la cadena liviana variable, seleccionadas del grupo que consiste en:

(a) SEQ ID NO: 13 and 14;

(b) SEQ ID NO: 26 y 27;

- (c) SEQ ID NO: 39 y 40;
- (d) SEQ ID NO: 52 y 53;
- (e) SEQ ID NO: 52 y 54;
- (f) SEQ ID NO: 71 y 72;
- (g) SEQ ID NO: 84 y 85;
- (h) SEQ ID NO: 97 y 98;
- (i) SEQ ID NO: 97 y 99;
- (j) SEQ ID NO: 115 y 116;
- (k) SEQ ID NO: 128 y 129;
- (l) SEQ ID NO: 128 y 130; y
- (m) SEQ ID NO: 335 y 336.

16. Un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de fijación al antígeno de este, **caracterizado** porque se fija al receptor de TNF inducible por glucocorticoides (GITR) que comprende:

(a) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 20, 21 y 22, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 23, 24 y 25, respectivamente;

(b) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 33, 34 y 35, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente;

(c) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 46, 47 y 48, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 49, 50 y 51, respectivamente;

(d) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 62, 63 y 64, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 65, 66 y 67, respectivamente;

(e) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 62, 63 y 64, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 68, 69 y 70, respectivamente;

(f) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 78, 79 y 80, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 81, 82 y 83, respectivamente;

(g) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 91, 92 y 93, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 94, 95 y 96, respectivamente;

(h) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 106, 107 y 108, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 109, 110 y 111, respectivamente;

(i) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 106, 107 y 108, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 112, 113 y 114, respectivamente;

(j) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 122, 123 y 124, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 125, 126 y 127, respectivamente;

(k) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 138, 139 y 140, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 141, 142 y 143, respectivamente;

(l) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 138, 139 y 140, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 144, 145 y 146, respectivamente; o

(m) secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 342-344, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 345-347, respectivamente.

17. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la reivindicación 16, **caracterizado** porque el anticuerpo comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 20, 21 y 22, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 23, 24 y 25, respectivamente.

18. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la reivindicación 16, **caracterizado** porque el anticuerpo comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 33, 34 y 35, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente.

19. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la reivindicación 16, **caracterizado** porque el anticuerpo comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 46, 47 y 48, respectivamente, y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 49, 50 y 51, respectivamente.

20. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de fijación al antígeno de este, **caracterizado** porque se fija al receptor de TNF inducible por glucocorticoides

(GITR) y comprende regiones variables de la cadena liviana y pesada, en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, 26, 39, 52, 71, 84, 97, 115, 128 y 335.

21. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de fijación al antígeno de este, **caracterizado** porque se fija al receptor de TNF inducible por glucocorticoides (GITR) y comprende regiones variables de la cadena liviana y pesada, en donde la región variable de la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, 27, 40, 53, 54, 72, 85, 98, 99, 116, 129, 130 y 336.

22. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de fijación al antígeno de este, **caracterizado** porque se fija al receptor de TNF inducible por glucocorticoides (GITR) y comprende secuencias de regiones variables de la cadena liviana y pesada al menos 85 % idénticas a las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente;
- (b) SEQ ID NO: 26 y 27, respectivamente;
- (c) SEQ ID NO: 39 y 40, respectivamente;
- (d) SEQ ID NO: 52 y 53, respectivamente;
- (e) SEQ ID NO: 52 y 54, respectivamente;
- (f) SEQ ID NO: 71 y 72, respectivamente;
- (g) SEQ ID NO: 84 y 85, respectivamente;
- (h) SEQ ID NO: 97 y 98, respectivamente;
- (i) SEQ ID NO: 97 y 99, respectivamente;
- (j) SEQ ID NO: 115 y 116, respectivamente;
- (k) SEQ ID NO: 128 y 129, respectivamente;
- (l) SEQ ID NO: 128 y 130, respectivamente; y
- (m) SEQ ID NO: 335 y 336, respectivamente.

23. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la reivindicación 22, **caracterizado** porque las regiones variables de la cadena liviana y pesada comprenden una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a las regiones variables de la cadena liviana y pesada seleccionadas del grupo que consiste en (a)-(m).

24. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la reivindicación 23, **caracterizado** porque la región variable de la cadena liviana y

pesada comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a las regiones variables de la cadena liviana y pesada seleccionadas del grupo que consiste en (a)-(m).

25. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la reivindicación 24, **caracterizado** porque la región variable de la cadena pesada y liviana comprende las regiones variables de la cadena pesada y liviana seleccionadas del grupo que consiste en (a)-(m).

26. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la reivindicación 25, **caracterizado** porque el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO: 13 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO: 14.

27. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la reivindicación 25, **caracterizado** porque el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO: 26 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO: 27.

28. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la reivindicación 25, **caracterizado** porque el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO: 39 y/o una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO: 40.

29. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de fijación al antígeno de este, **caracterizado** porque se fija al receptor de TNF inducible por glucocorticoides (GITR) y comprende secuencias de la cadena liviana o pesada al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) SEQ ID NO: 15 y 16, respectivamente;
- (b) SEQ ID NO: 17 y 19, respectivamente;
- (c) SEQ ID NO: 18 y 19, respectivamente;
- (d) SEQ ID NO: 28 y 29, respectivamente;
- (e) SEQ ID NO: 30 y 32, respectivamente;
- (f) SEQ ID NO: 31 y 32, respectivamente;
- (g) SEQ ID NO: 41 y 42, respectivamente;
- (h) SEQ ID NO: 43 y 45, respectivamente;

- (i) SEQ ID NO: 44 y 45, respectivamente;
- (j) SEQ ID NO: 55 y 56, respectivamente;
- (k) SEQ ID NO: 55 y 57, respectivamente;
- (l) SEQ ID NO: 58 y 60, respectivamente;
- (m) SEQ ID NO: 59 y 60, respectivamente;
- (n) SEQ ID NO: 58 y 61, respectivamente;
- (o) SEQ ID NO: 59 y 61, respectivamente;
- (p) SEQ ID NO: 73 y 74, respectivamente;
- (q) SEQ ID NO: 75 y 77, respectivamente;
- (r) SEQ ID NO: 76 y 77, respectivamente;
- (s) SEQ ID NO: 86 y 87, respectivamente;
- (t) SEQ ID NO: 88 y 90, respectivamente;
- (u) SEQ ID NO: 89 y 90, respectivamente;
- (v) SEQ ID NO: 102 y 104, respectivamente;
- (w) SEQ ID NO: 103 y 104, respectivamente;
- (x) SEQ ID NO: 100 y 101, respectivamente;
- (y) SEQ ID NO: 100 y 371, respectivamente;
- (z) SEQ ID NO: 102 y 105, respectivamente;
- (za) SEQ ID NO: 103 y 105, respectivamente;
- (zb) SEQ ID NO: 117 y 118, respectivamente;
- (zc) SEQ ID NO: 119 y 121, respectivamente;
- (zd) SEQ ID NO: 120 y 121, respectivamente;
- (ze) SEQ ID NO: 131 y 132, respectivamente;
- (zf) SEQ ID NO: 134 y 136, respectivamente;
- (zg) SEQ ID NO: 135 y 136, respectivamente;
- (zh) SEQ ID NO: 131 y 133, respectivamente;
- (zi) SEQ ID NO: 134 y 137, respectivamente;
- (zj) SEQ ID NO: 135 y 137, respectivamente;
- (zk) SEQ ID NO: 337 y 338, respectivamente;
- (zl) SEQ ID NO: 339 y 341, respectivamente; y
- (zm) SEQ ID NO: 340 y 341, respectivamente.

30. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la reivindicación 29, **caracterizado** porque las cadenas pesadas y livianas comprenden las cadenas pesadas y livianas seleccionadas del grupo que consiste en (a)-(zm).

31. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la

reivindicación 30, **caracterizado** porque el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO: 17 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO: 19.

32. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la reivindicación 30, **caracterizado** porque el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO: 18 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO: 19.

33. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de fijación al antígeno de este, **caracterizado** porque (a) se fija al mismo epítipo en GITR que en el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 25, e (b) inhibe la fijación del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 25 a GITR en linfocitos T activados al menos un 90 % según mediciones mediante FACS.

34. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15-33, **caracterizado** porque el anticuerpo se fija a PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) y CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218) de GITR humano maduro (SEQ ID NO: 4).

35. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15-34, **caracterizado** porque el anticuerpo se fija a GITR humano y de *Macaca fascicularis*.

36. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o una variante de estas.

37. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la reivindicación 36, **caracterizado** porque el anticuerpo es un anticuerpo IgG1.

38. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la reivindicación 36, **caracterizado** porque el anticuerpo comprende un Fc de IgG1 no efector.

39. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con la reivindicación 38, **caracterizado** porque el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, comprende un Fc de IgG1 no efector que comprende las siguientes mutaciones: L234A, L235E, G237A, A330S y P331S.

40. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 36, **caracterizado** porque el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, comprende un Fc con fijación

mejorada a un FcγR activador.

41. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque los residuos de metionina en las regiones CDR se sustituyen por residuos de aminoácidos que no se someten a oxidación.

42. El anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15-41, **caracterizado** porque el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, es un anticuerpo humano o humanizado.

43. Una molécula biespecífica **caracterizada** porque comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores ligado a una molécula que tiene una segunda especificidad de fijación.

44. Un ácido nucleico **caracterizado** porque codifica la región variable de la cadena pesada y/o liviana del anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-42.

45. Un vector de expresión **caracterizado** porque comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 44.

46. Una célula **caracterizada** porque se transforma con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 45.

47. Un inmunoconjugado **caracterizado** porque comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-42 ligado a un agente.

48. Una composición **caracterizada** porque comprende el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, una molécula biespecífica o un inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-43 y 47, y un portador.

49. Un kit **caracterizado** porque comprende el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, o una molécula biespecífica o inmunoconjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-43 y 47 e instrucciones de uso.

50. Un método para preparar un anticuerpo anti-GITR, o una porción de fijación al antígeno de este, **caracterizado** porque comprende expresar el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, en la célula de acuerdo con la reivindicación 46 y aislar el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de la célula.

51. Un método para estimular una respuesta de linfocitos T específicos del antígeno **caracterizado** porque comprende poner en contacto el linfocito T con el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, una molécula biespecífica o un inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-43 y 47 de

modo que la respuesta de linfocitos T específicos del antígeno se estimule.

52. Un método para activar o coestimular un linfocito T efector, **caracterizado** porque comprende poner en contacto un linfocito T efector con un anticuerpo anti-GITR, o una porción de fijación al antígeno de este, una molécula biespecífica o un inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-43 y 47 y CD3, en donde el linfocito T efector se activa o se coestimula.

53. Un método para aumentar la producción de IL-2 y/o IFN- γ en un linfocito T, **caracterizado** porque comprende poner en contacto el linfocito T con una cantidad eficaz del anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, una molécula biespecífica o un inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-43 y 47.

54. Un método para aumentar la proliferación de linfocitos T **caracterizado** porque comprende poner en contacto el linfocito con una cantidad eficaz del anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, una molécula biespecífica o un inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-43 y 47.

55. Un método para aumentar la producción de IL-2 y/o IFN- γ en linfocitos T en un sujeto, **caracterizado** porque comprende administrar una cantidad eficaz del anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, una molécula biespecífica o un inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-43 y 47, para aumentar la producción de IL-2 y/o IFN- γ en linfocitos T.

56. Un método para reducir o disminuir la cantidad de linfocitos T reguladores en un tumor de un sujeto que lo necesita, **caracterizado** porque comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, una molécula biespecífica o un inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-43 y 47, en donde el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, tiene una función efectora o efectora mejorada, para reducir la cantidad de linfocitos T reguladores en el tumor.

57. Un método para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto, **caracterizado** porque comprende administrar a un sujeto el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, la molécula biespecífica o el inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-43 y 47, de manera que se estimule una respuesta inmunitaria en el sujeto.

58. El método de acuerdo con la reivindicación 57, **caracterizado** porque el sujeto tiene un tumor, y se estimula una respuesta inmunitaria contra el tumor.

59. Un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto, que

comprende administrarle al sujeto el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, la molécula biespecífica o el inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-43 y 47, de manera que se inhiba el crecimiento tumoral en el sujeto.

60. Un método para tratar el cáncer **caracterizado** porque comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, la molécula biespecífica o el inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-43 y 47, para tratar el cáncer.

61. El método de acuerdo con la reivindicación 60, **caracterizado** porque el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer útero/cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de esófago, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de células germinales, cáncer óseo, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer de piel, neoplasma del sistema nervioso central, linfoma, leucemia, mieloma, sarcoma y cáncer relacionado con virus.

62. El método de acuerdo con la reivindicación 60 o 61, **caracterizado** porque el cáncer es un cáncer metastásico, cáncer refractario o cáncer recurrente.

63. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 56-62, **caracterizado** porque también comprende administrar uno o más tratamientos adicionales.

64. El método de acuerdo con la reivindicación 63, **caracterizado** porque el tratamiento adicional es un anticuerpo anti-PD1, un anticuerpo LAG-3, un anticuerpo CTLA-4 o un anticuerpo PD-L1.

65. Un método para detectar la presencia del receptor TNF inducible por glucocorticoides (GITR) en una muestra **caracterizado** porque comprende poner en contacto la muestra con el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-42, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo, o una porción de fijación al antígeno de este, y GITR, y detectar la formación de un complejo.

66. Un anticuerpo anti-GITR aislado que comprende una región constante de la cadena pesada modificada **caracterizado** porque comprende una bisagra de IgG2 y al menos uno de CH1, CH2 y CH3 que no es un isotipo IgG2, en donde el anticuerpo anti-GITR tiene actividad agonista mejorada con respecto al mismo anticuerpo anti-GITR pero con una bisagra de no IgG2.

67. El anticuerpo anti-GITR aislado de acuerdo con la reivindicación 66, **caracterizado** porque la región constante de la cadena pesada modificada comprende una región constante de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 223-226 y 283-290, o una región constante de la cadena pesada que difiere de aquella en, como máximo, 5 aminoácidos o es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 223-226 y 283-290.

68. El anticuerpo anti-GITR aislado de acuerdo con la reivindicación 67, **caracterizado** porque la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 17, 18, 28, 30, 31, 41, 43, 44, 55, 58, 59, 73, 75, 76, 86, 88, 89, 100, 102, 103, 117, 119, 120, 131, 134, 135, 227-275, 337, 339, 340, 348-352, 361 y 362, o una cadena pesada que difiere de aquella en, como máximo, 10 aminoácidos o es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, 17, 18, 28, 30, 31, 41, 43, 44, 55, 58, 59, 73, 75, 76, 86, 88, 89, 100, 102, 103, 117, 119, 120, 131, 134, 135, 227-275, 337, 339, 340, 348-352, 361 y 362.

BUENOS AIRES, JUNIO 2015.

RESUMEN

ANTICUERPOS CONTRA EL RECEPTOR DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL INDUCIDO POR GLUCOCORTICOIDES (GITR) Y SUS USOS

Anticuerpos, o porciones de fijación al antígeno de estos, que se fijan al receptor de TNF inducible por glucocorticoides (GITR). También, usos de estas proteínas en aplicaciones terapéuticas, tales como el tratamiento del cáncer. Además, células que producen los anticuerpos, polinucleótidos que codifican la región variable de la cadena pesada y/o liviana y vectores que comprenden los polinucleótidos que codifican la región variable de la cadena pesada y/o liviana de los anticuerpos

