

Anticuerpos anti-OX40 humanizados y usos de los mismos**ANTECEDENTES**

OX40 (CD134; TNFRSF4) es un receptor del factor de necrosis tumoral que se encuentra principalmente en células T CD4⁺ y CD8⁺ activadas, células T reguladoras (Treg) y células asesinas naturales (NK)(Croft *et al.*, 2009, *Immunol Rev.* 229:173-91). OX40 tiene un ligando endógeno conocido, el ligando OX40 (OX40L; CD152; TNFSF4), que existe en una forma trimérica y puede agrupar OX40, resultando potentes eventos de señalización celular dentro de células T. *Id.* La señalización a través de OX40 en células T CD4⁺ y CD8⁺ activadas conduce a la producción potenciada de citoquinas, a la liberación de granzimas y perforinas y a la expansión de agrupaciones de células T efectoras y de la memoria *et al.*, 2010, *Semin Oncol.* 37:524-32). Además, la señalización OX40 sobre las células Treg inhibe la expansión de las Treg, cierra la inducción de las Tregs y bloquea la función supresora de las Tregs (Voo *et al.* 2013, *J Immunol.* 191:3641-50; Vu *et al.*, 2007, *Blood.* 110:2501-10).

Los estudios de inmunohistoquímica y los análisis iniciales de citometría de flujo demostraron que OX40 se expresó en células T que infiltraban un amplio intervalo de cánceres humanos (Baruah *et al.*, 2011, *Immunobiology* 217:668-675; Curti *et al.*, 2013, *Cáncer Res.* 73:7189-98; Ladanyi *et al.*, 2004, *Clin Cancer Res.* 10:521-30; Petty *et al.*, 2002, *Am J Surg.* 183:512-8; Ramstad *et al.*, 2000, *Am J Surg.* 179:400-6; Sarff *et al.*, 2008, *Am J Surg.* 195:621-5; discussion 625; Vetto *et al.*, 1997, *Am J Surg.* 174:258-65). Aunque no se desea estar ligados por la teoría, la expresión de OX40 en linfocitos infiltrantes de tumores se correlaciona con una supervivencia más larga en varios cánceres humanos,

sugiriendo que las señales de OX40 pueden jugar un papel en establecer una respuesta inmune antitumoral (Ladanyi *et al.*, 2004, *Clin Cancer Res.* 10:521-30; Petty *et al.*, 2002, *Am J Surg.* 183:512-8).

5 En una variedad de modelos no clínicos de tumores de ratón, agonistas de OX40, incluyendo los anticuerpos y las proteínas de fusión del ligando de OX40, se han utilizado satisfactoriamente con resultados prometedores (Kjaergaard *et al.*, 2000, *Cancer Res.* 60:5514-21; Ndhlovu *et al.*, 2001, 10 *J Immunol.* 167:2991-9; Weinberg *et al.*, 2000, *J Immunol.* 164:2160-9). La co-estimulación de células T a través de OX40 promovió la actividad anti-tumoral que, en algunos casos, fue duradera, proporcionando una protección a largo plazo frente al estímulo tumoral posterior (Weinberg *et al.*, 15 2000, *J Immunol.* 164:2160-9). La inhibición de células Treg y la co-estimulación de células T efectoras demostraron ser necesarias para la inhibición del crecimiento del tumor de agonistas de OX40 (Piconese *et al.*, 2008, *J Exp Med.* 205:825-39). Se han explorado muchas estrategias y tecnologías para 20 aumentar el efecto antitumoral del tratamiento con el agonista de OX40 a través de combinaciones con vacunas, quimioterapia, radioterapia, e inmunoterapia (Jensen *et al.*, 2010, *Semin Oncol.* 37:524-32; Melero *et al.*, 2013, *Clin Cancer Res.* 19:997-1008).

25 SUMARIO

Esta descripción proporciona anticuerpos que se unen a OX40, *p. ej.*, OX40 humano. En determinados aspectos, los anticuerpos proporcionados son anticuerpos humanizados. Por ejemplo, esta descripción proporciona un anticuerpo o 30 fragmento de unión a antígeno del mismo que incluye una región variable de la cadena pesada (VH) humanizada y una

región variable de la cadena ligera (VL) humanizada, en que la VH incluye una secuencia de aminoácidos con la fórmula:

HFW1-HCDR1-HFW2-HCDR2-HFW3-HCDR3-HFW4,

en que HFW1 es SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7, HCDR1 es SEQ ID
5 NO: 8, HFW2 es SEQ ID NO: 9 (WIRX₃₉HPGKGGLEX₄₇X₄₈G; en que X₃₉
es Q o K, X₄₇ es W o Y, y X₄₈ es I o M), HCDR2 es SEQ ID NO:
14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16, HFW3 es SEQ ID NO: 17
(RITINX₇₁DTSKNQX₇₈SLQLNSVTPEDTAVYX₉₁CAR; en que X₇₁ es P o R,
X₇₈ es F o Y, y X₉₁ es Y o F, HCDR3 es SEQ ID NO: 25, SEQ ID
10 NO: 26 o SEQ ID NO: 27), y HFW4 es SEQ ID NO: 28, en que la
VL incluye la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 29 o SEQ
ID NO: 32; y en que el anticuerpo o fragmento del mismo se
puede unir específicamente a OX40 humano. En determinados
aspectos, la secuencia de aminoácidos de HFW2 es SEQ ID NO:
15 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 1, y en
determinados aspectos, la secuencia de aminoácidos de HFW3
es SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO:
21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24.

En determinados aspectos, la VH del anticuerpo
20 proporcionado o fragmento del mismo incluye la secuencia de
aminoácidos SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37,
SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45,
SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53,
SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61,
25 SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 67. En determinados
aspectos, la VL del anticuerpo proporcionado o fragmento del
mismo incluye la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 29 y
la VH incluye la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 59.

En determinados aspectos, el anticuerpo proporcionado
30 o fragmento del mismo incluye una región constante de la
cadena ligera o fragmento de la misma condensada al extremo

C de la VL, *p. ej.*, una región constante kappa humana o una región constante lambda humana. En determinados aspectos, el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo incluye, además, una región constante de la cadena pesada o fragmento de la misma condensada al extremo C de la VH, *p. ej.*, una
5 región constante de IgG1 humana, una región constante de IgG4P humana, una región constante de IgG1TM humana o una región constante de IgG1 murina. En determinados aspectos, la región constante de la cadena pesada es una región
10 constante de IgG1 humana. En determinados aspectos, el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo incluye la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada SEQ ID NO: 71 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera SEQ ID NO: 30. Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, tal
15 como se proporciona por esta descripción, puede ser, *p. ej.*, un fragmento FV, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento dsFv, un fragmento scFv o un fragmento sc(Fv)₂, o cualquier combinación de los mismos.

En determinados aspectos, el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo se puede unir específicamente a OX40 humano de mono cynomolgus o mono rhesus, *p. ej.*, se puede unir específicamente a OX40 tal como se expresa en células Jurkat, células T CD4⁺ o CD8⁺ activadas primarias de seres humanos, mono cynomolgus o mono rhesus, o cualquier
25 combinación de las mismas. En determinados aspectos, el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo no se une a OX40 murino o de rata. En determinados aspectos, el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo no reacciona de forma cruzada con proteínas TNFRSD relacionadas.

30 En determinados aspectos, el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo puede tener una afinidad de unión por

OX40 humano expresado en células T CD4⁺ de aproximadamente 250 pM a aproximadamente 370 pM según se mide por citometría de flujo, *p. ej.*, aproximadamente 312 pM. En determinados aspectos, el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo
5 puede conseguir una ocupación del receptor del 20% en células T CD4⁺ T humanas activadas primarias (CE₂₀) a aproximadamente 63 hasta aproximadamente 93 pM, una ocupación del receptor del 50% en células T CD4⁺ T humanas activadas primarias (CE₅₀) a aproximadamente 250 hasta aproximadamente 370 pM y una
10 ocupación del receptor del 90% en células T CD4⁺ T humanas activadas primarias (CE₉₀) a aproximadamente 2290 hasta aproximadamente 3330 pM según se mide por citometría de flujo. Por ejemplo, en determinados aspectos la CE₂₀) es aproximadamente 78 pM, la la CE₅₀) es aproximadamente 312 pM
15 y la la CE₉₀) es aproximadamente 2810 pM.

En determinados aspectos, el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo puede tener una afinidad de unión para OX40 humano, expresada en células Jurkat que sobre-expresan OX40 de aproximadamente 250 pM a aproximadamente 600 pM según
20 se mide por citometría de flujo, *p. ej.*, aproximadamente 424 pM. En determinados aspectos, el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo puede conseguir una CE₂₀ en células Jurkat que sobre-expresan OX40 a aproximadamente 60 a aproximadamente 150 pM, una CE₅₀ en células Jurkat que sobre-
25 expresan OX40 a aproximadamente 250 a aproximadamente 600 pM y una CE₉₀ en células Jurkat que sobre-expresan OX40 a aproximadamente 2260 a aproximadamente 4380 pM según se mide por citometría de flujo. Por ejemplo, en determinados aspectos, la CE₂₀ es aproximadamente 106 pM, la CE₅₀ es
30 aproximadamente 424 pM y la CE₉₀ es aproximadamente 3820 pM.

En determinados aspectos, el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo puede tener una afinidad de unión para OX40 de mono cynomolgus, expresada en células T CD4⁺ de mono cynomolgus activadas primarias de aproximadamente 340 pM a aproximadamente 820 pM según se mide por citometría de flujo, *p. ej.*, aproximadamente 580 pM. En determinados aspectos, el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo puede tener una afinidad de unión para OX40 de mono rhesus, expresada en células T CD4⁺ de mono rhesus activadas primarias de aproximadamente 130 pM a aproximadamente 600 pM según se mide por citometría de flujo, *p. ej.*, aproximadamente 370 pM.

En determinados aspectos, el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo puede inducir una proliferación dependiente de la dosis de células T CD4⁺ activadas y una liberación de citoquinas dependiente de la dosis en células T CD4⁺ activadas primarias en un ensayo basado en placa. Por ejemplo, en determinados aspectos, se puede conseguir una respuesta a la proliferación máxima del 20% (CE₂₀) en células T CD4⁺ humanas activadas primarias a una concentración del anticuerpo de aproximadamente 14 pM a aproximadamente 28 pM, se puede conseguir una respuesta a la proliferación máxima del 50% (CE₅₀) en células T CD4⁺ humanas activadas primarias a una concentración del anticuerpo de aproximadamente 0.3 pM a aproximadamente 130 pM y se puede conseguir una respuesta a la proliferación máxima del 90% (CE₉₀) en células T CD4⁺ humanas activadas primarias a una concentración del anticuerpo de aproximadamente 50 pM a aproximadamente 90 pM, todas según se mide por citometría de flujo. En determinados aspectos, la CE₂₀ es aproximadamente 21 pM, la CE₅₀ es aproximadamente 28 pM y la CE₉₀ es aproximadamente 72

pM. La citoquina liberada en células T CD4⁺ humanas activadas primarias puede ser una, dos, tres o más de, sin limitación, IFN γ , TNF α , IL-5, IL-10, IL-2, IL-4, IL-13, IL-8, IL-12 p70, IL-1 β , o cualquier combinación de los mismos, por ejemplo, IFN γ , TNF α , IL-5, IL-10, IL-13, o cualquier combinación de los mismos. En determinados aspectos, el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo puede conseguir una proliferación de células T CD4⁺ y una liberación de citoquina en células T CD4⁺ de mono cynomolgus activadas primarias y en células T CD4⁺ de mono rhesus activadas primarias.

En determinados aspectos, el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo puede activar la vía de NF κ B en células T que expresan OX40 en presencia de células que expresan Fc γ R. Por ejemplo, células T que expresan OX40 pueden ser células informadoras de NF κ B-luciferasa Jurkat que sobre-expresan OX40, que producen luciferasa en respuesta a la estimulación de la vía de señalización de NF κ B. En determinados aspectos, el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo puede desencadenar una citotoxicidad celular dependiente del complemento o dependiente del anticuerpo contra células que expresan OX40. En determinados aspectos, el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo puede unirse a C1q humano y desencadenar una citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo, mediada por NK, contra las células que expresan OX40.

En determinados aspectos, la administración de una dosis eficaz del anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo a un sujeto en necesidad de tratamiento contra el cáncer puede inhibir el crecimiento del tumor en el sujeto. Por ejemplo, la inhibición del crecimiento del tumor se puede conseguir en presencia de células T. En determinados

aspectos, el crecimiento del tumor es inhibido en al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60% o al menos un 70%, comparado con la administración de un anticuerpo control emparejado en el isotipo o fragmento del mismo.

Esta descripción proporciona, además, una composición que incluye el anticuerpo o fragmento del mismo tal como se describe arriba, y un soporte.

Esta descripción proporciona, además, un polinucleótido que incluye un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo, o codifica una subunidad de polipéptido del anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo. En determinados aspectos, el polinucleótido proporcionado incluye el ácido nucleico de SEQ ID NO: 60, el ácido nucleico de SEQ ID NO: 31, el ácido nucleico de SEQ ID NO: 72, o cualquier combinación de los mismos. Esta descripción proporciona, además, un vector que incluye el polinucleótido proporcionado y una célula huésped que incluye el polinucleótido proporcionado o el vector proporcionado. En otro aspecto, la descripción proporciona un método de producir un anticuerpo o fragmento del mismo, en que el método incluye cultivar la célula huésped proporcionada bajo condiciones en las que se expresa el anticuerpo o fragmento del mismo codificado por el polinucleótido, y recuperar el anticuerpo o fragmento del mismo.

En aspectos adicionales, la descripción proporciona un método para fomentar la supervivencia o la proliferación de células T activadas, en que el método incluye poner en contacto células T activadas con el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo, y en que el anticuerpo o fragmento

del mismo se puede unir específicamente a OX40 en la superficie de las células T.

En aspectos adicionales, la descripción proporciona un método de inducir la liberación de citoquinas de células T activadas, en que el método incluye poner en contacto células T activadas con el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo, y en que el anticuerpo o fragmento del mismo se puede unir específicamente a OX40 en la superficie de las células T. En determinados aspectos, la citoquina liberada puede ser una, dos, tres o más de, sin limitación, $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-5, IL-10, IL-2, IL-4, IL-13, IL-8, IL-12 p70, IL-1 β , o cualquier combinación de los mismos, *p. ej.*, $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-5, IL-10, IL-13, o cualquier combinación de los mismos. En determinados aspectos, las células T activadas son células T CD4⁺ activadas, células T CD8⁺ activadas, o una combinación de las mismas. En determinados aspectos, las células T CD4⁺ activadas son células T CD4⁺ humanas, células T CD4⁺ de mono cynomolgus, células T CD4⁺ de mono rhesus, o una combinación de las mismas.

En aspectos adicionales, la descripción proporciona un método de fomentar la activación de células T, en que el método incluye poner en contacto las células T con el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo, en que el anticuerpo o fragmento del mismo se puede unir específicamente a OX40 sobre la superficie de las células T. En determinados aspectos, la activación de células T se puede medir a través de la estimulación de la vía de transducción de señales NF κ B. En determinados aspectos, las células T son células T CD4⁺ activadas, células T CD8⁺ activadas, o una combinación de las mismas. En determinados aspectos, las células T CD4⁺ activadas son células T CD4⁺ humanas, células

T CD4⁺ de mono cynomolgus, células T CD4⁺ de mono rhesus, o una combinación de las mismas. En determinados aspectos, la puesta en contacto incluye administrar una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento del mismo a un sujeto.

5 En aspectos adicionales, la descripción proporciona un método de tratar el cáncer en un sujeto, en que el método incluye administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento una cantidad eficaz del anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo, o la composición proporcionada. En determinados
10 aspectos, el cáncer es un tumor sólido. En determinados aspectos, la administración del anticuerpo o fragmento del mismo o composición puede inhibir el crecimiento del tumor, puede fomentar la reducción del tumor, o ambos. En determinados aspectos, la inhibición del crecimiento del
15 tumor se consigue en presencia de células T.

En aspectos adicionales, la descripción proporciona un método de potenciar una respuesta inmune en un sujeto, en que el método incluye administrar a un sujeto en necesidad de la misma una cantidad terapéuticamente eficaz del
20 anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo, o la composición proporcionada.

En los métodos terapéuticos proporcionados por esta descripción, el sujeto a tratar puede ser un sujeto humano.

En determinados aspectos, el anticuerpo proporcionado
25 o fragmento del mismo se puede unir a un epítopo de OX40 humano que cae dentro de los aminoácidos 108 a 146 de SEQ ID NO: 91. En determinados aspectos, el epítopo incluye al menos los aminoácidos leucina 116 (L116) y alanina 126 (A126) de SEQ ID NO: 91. En determinados aspectos, el anticuerpo
30 proporcionado o fragmento del mismo se puede unir a una variante de OX40 de ratón que tiene la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 92, excepto por una mutación Q113L y una mutación V124A.

Esta descripción proporciona, además, un péptido aislado que consiste en 100 o menos aminoácidos, en que el péptido puede ser unido específicamente por el anticuerpo proporcionado o fragmento del mismo, En determinados aspectos, el péptido incluye los aminoácidos 116 a 126 de SEQ ID NO: 91. En determinados aspectos, el péptido incluye los aminoácidos 108 a 146 de SEQ ID NO: 91, excepto por una, dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituciones, deleciones o inserciones de un solo aminoácido en cualquier posición, excepto L116 y A126.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

Figura 1. Mutaciones en las regiones 9B12 VH humanizadas: Los números en el apodo clonal representan la posición del aminoácido en VH de acuerdo con la numeración de Kabat. Los Mabs 1, 2, 5 y 8 son variantes quiméricas de VH emparejadas con VL humanizada. Los Mabs 10-17 son variantes de VH humanizadas con retromutaciones de ratón. Los Mabs 18.27 son variantes modificadas para eliminar potenciales responsabilidades de la secuencia. Regiones variables de Mab24 y mAB27 fueron injertadas en diferentes regiones constantes pesadas para las variantes de isotipo resultantes denominadas mAb28-30 y mAb31-32, mAb37, respectivamente.

Figura 2A-D. Unión de OX40mAb24 y 9B12 a OX40 Expresado sobre la Superficie de células CD4⁺ Humanas Activadas Primarias. MFI = intensidad de fluorescencia media de la unión del anticuerpo anti-humano secundario marcado con AlexaFluor® 647 a OX40mAb24 (2A-B) o unión del anticuerpo

anti-ratón secundario marcado con AlexaFluor® 488 a 9B12 (2C-D) en células T CD4⁺ humanas primarias.

Figura 3A-F. Unión de OX40mAb24 y 9B12 OX40 Humano Expresado en células T Jurkat. MFI = intensidad de fluorescencia media de la unión del anticuerpo anti-humano secundario marcado con AlexaFluor® 647 a OX40mAb24 (3A-C) o unión del anticuerpo anti-ratón secundario marcado con AlexaFluor® 488 a 9B12 (3D-F) en células T Jurkat.

Figura 4A-B. Unión de OX40mAb24 a células HEK293 que expresan TNFRSF y células T Jurkat que expresan OX40. (4A) Expresión transitoria de miembros TNFRSF, tal como se indica a la izquierda de los histogramas, en células HEK293, y unión a mAbs específicos para TNFRSF o a OX40mAb24, tal como se indica en la parte superior de los histogramas. Histograma gris, unión del anticuerpo control de isotipo conjugado con fluorocromo para mAb específico para TNFRSF, o control de unión al anticuerpo secundario anti-humano de cabra AlexaFluor® 647 para OX40mAb24; histograma en blanco, mAb específico para TNFRSF o unión a OX40mAb24. (4B): Unión de OX40mAb24 a Jurkat que expresan OX40 como un control positivo. Histograma gris, control de unión del anticuerpo secundario anti-humano de cabra AlexaFluor® 647; histograma en blanco, unión a OX40mAb24.

Figura 5A-B. Unión de las CDRs (regiones determinantes de complementariedad) de OX40mAb24 (OX40mAb29) y 9B12 a miembros de TNFRSF humano recombinante mediante ELISA. Los resultados de los ensayos ELISA demuestran la unión específica de OX40 por parte de OX40mAb29 (5A) y 9B12 (5B). OX40mAb29 contiene las CDRs de OX40mAb24. La unión al anticuerpo de OX40 se comparó con la unión a otras proteínas TNFRSF humanas.

Figura 6. Diagrama esquemático del ensayo de bioactividad unido a placa de OX40mAb24. $\square$ =OX40mAb24; ∇ =clon OKT3 del anticuerpo CD3 anti-humano.

Figura 7A-C. Proliferación de células T CD4⁺ humanas en respuesta a OX40mAb24 y 9B12. (7A) Proliferación de células T CD4 de cuatro donantes independientes mediada por OX40mAb24 inmovilizado en placa en combinación con la estimulación sub-mitogénica de TCR (anti-CD3). Los puntos de datos se normalizaron al valor asintomático más bajo de curvas de datos en bruto antes de la representación para potenciar la visualización del intervalo dinámico de cada una de las respuestas. (7B) Datos en bruto representativos del Donante 651, que demuestran la proliferación impulsada por OX40mAb24 más estimulación sub-mitogénica de TCR (anti-CD3) y la carencia relativa de la proliferación mediada por el mAb de control IgG1 humano R347, OX40mAb24 soluble en presencia o ausencia de señalización concomitante de TCR, mAb anti-CD3 solo sin OX40mAb24, y mediante OX40mAb24 inmovilizado en placa en ausencia del mAb anti-CD3. (7C) Proliferación de células T CD4 de cuatro donantes independientes mediada por 9B12 inmovilizado en placa en combinación con la estimulación sub-mitogénica de TCR. Símbolos, valores medios; Barras de errores, desviación típica de la media; n=3 réplicas técnicas para OX40mAb24, mAb de control IgG1 humano R347 y 9B12, todas en combinación con anti-CD3; n=2 réplicas técnicas para OX40mAb24 soluble y CD3 en ausencia de OX40mAb24, OX40mAb24 unido a placa sin anti-CD3 y OX40mAb24 soluble sin anti-CD3.

Figura 8A-E. Liberación de Citoquina de células T CD4⁺ humanas en Respuesta a OX40mAb24. OX40mAb24 representativa inducía la liberación de citoquina de células T CD4 humanas para el Donante 651, incluyendo (8A) IFN γ , (8B) TNF α (8C)

IL-10 (8D) IL-13 y (8E) IL-5. Símbolos, valores medios; Barras de errores, desviación típica de la media; n=3 réplicas técnicas para OX40mAb24 y mAb de control IgG1 humano R347, ambas en combinación con anti-CD3; n=2 réplicas técnicas para OX40mAb24 soluble, OX40mAb24 soluble sin anti-CD3 y anti-CD3 en ausencia de OX40mAb24.

Figura 9A-E. Liberación de Citoquina de células T CD4⁺ humanas en Respuesta a 9B12. 9B12 representativa inducía la liberación de citoquinas de células T CD4 para el Donante 651, incluyendo (9A) IFN γ , (9B) TNF α (9C) IL-10 (9D) IL-13 y (9E) IL-5. Símbolos, valores medios; Barras de errores, desviación típica de la media; n=3 réplicas técnicas para 9B12 y mAb de control IgG1 de ratón, ambas en combinación con anti-CD3; n=2 réplicas técnicas para 9B12 soluble, 9B12 soluble sin anti-CD3 y anti-CD3 en ausencia de 9B12.

La Figura 10 es un esquema que ilustra sistemas de células para medir la bioactividad de OX40mAb24 y 9B12. La reticulación de OX40mAb24 por parte de células que expresan Fc γ R media en la agrupación y activación de OX40 sobre la superficie de las células de una línea celular informadora de NF κ B-luciferasa Jurkat que expresa OX40, resultando en la producción, mediada por F κ B, de luciferasa que se puede medir como un sustituto para la activación de OX40. Fc γ R = fragmento del receptor gamma cristalizable; NF κ B = factor kappa B nuclear.

Figuras 11A-D. Bioactividad de OX40mAb24 en células informadoras de NF κ B Jurkat que expresan OX40, con y sin reticulación por parte de Fc γ R. Actividad dependiente de la actividad (en RLU) de la señalización inducida por OX40mAb24 a través de OX40 humano expresado sobre la superficie de las

células de una línea celular informadora de NFκB-luciferasa Jurkat en un bioensayo de 2 células. Actividad de informador después de reticulación de OX40mAb24 por parte de (11D) células HEK293 que expresan CD32A y células parentales HEK293 (HEK) en presencia de (11B) células HEK293 que expresan CD32B, (11C) células Raji B u (11D) células CD45⁺ aisladas a partir de un tumor pulmonar primario. Los datos son representativos de otros resultados encontrados en la Tabla 5-2. mAb = anticuerpo monoclonal, RLU = unidades de luz relativas.

Figuras 12A-D. Bioactividad de 9B12 en células informadoras de NFκB Jurkat que expresan OX40, utilizando la reticulación de FcγR por parte de Diferentes Tipos de Células en Ensayos de Bioactividad de 2 Células. Actividad dependiente de la actividad (en RLU) de la señalización inducida por 9B12 a través de OX40 humano expresado sobre la superficie de las células de una línea celular informadora de NFκ-luciferasa Jurkat en un bioensayo de dos células. Actividad de informador después de reticulación de 9B12 por parte de (12A) células HEK293 que expresan CD32A, (12B) células HEK293 que expresan CD32B, (12C) células Raji B o (12D) células CD45⁺ aisladas a partir de un tumor pulmonar primario. Los datos son representativos de otros resultados encontrados en la Tabla 5-3. mAb = anticuerpo monoclonal, RLU = unidades de luz relativas.

Figura 13A-B. Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos mediada por Células Asesinas Naturales de OX40mAb24, Experimento 1. (13A) Exterminio específico de células T CD4⁺ activadas que expresan OX40 por parte de células NK humanas a partir de una NK alogeneica, izquierda, o autóloga, derecha, y pares donantes de células T CD4⁺

utilizando 10 μ /mL de 9B12, OX40mAb24, o el mutante triple de IgG1 (mAb29) o versiones IgG4P (mAb28) humanas de OX40mAb24. (13B) Lisis de células Toledo B por parte de células NK de donantes 350 y 351 en presencia de rituximab, pero no anticuerpo control del isotipo IgG1 humano R347. Las réplicas técnicas se realizaron por triplicado. Las Barras de errores representan el error típico de la media. ADCC = citotoxicidad dependiente del fármaco-anticuerpo; mAb = anticuerpo monoclonal; NK = asesina natural.

Figura 14A-B. Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos mediada por Células Asesinas Naturales de OX40mAb24, Experimento 2. (14A) Exterminio específico de células T CD4 activadas que expresan OX40 por parte de células NK humanas a partir de una NK alogeneica, izquierda, o autóloga, derecha, y pares donantes de células T CD4 utilizando 10 μ /mL de IgG1 humana R347, 9B12, OX40mAb24, IgG4E humana (mAb28) o el mutante triple de IgG1 (mAb29) o versiones de OX40mAb24. (14B) Lisis de células Toledo B por parte de células NK de donantes 558 y 589 en presencia de rituximab, pero no anticuerpo control del isotipo IgG1 humano R347. Las réplicas técnicas se realizaron por triplicado. Las Barras de errores representan el error típico de la media. ADCC = citotoxicidad dependiente del fármaco-anticuerpo; mAb = anticuerpo monoclonal; NK = asesina natural.

Figura 15A-D. Evaluación de la Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos mediada por Células Asesinas Naturales de OX40mAb24 y 9B12, Experimento 3. (15A-B) Exterminio específico de células T CD4 humanas que expresan OX40 mediado por OX40mAb24, pero no por 9B12, utilizando células NK humanas primarias de dos donantes separados tal

como se indica. (15C-D) Lisis de células Toledo B por parte de células NK de donantes 363 y 504 en presencia de rituximab, pero no anticuerpo control del isotipo IgG1 humano R347. Las réplicas técnicas se realizaron por duplicado. Las
5 Barras de errores representan el error típico de la media. ADCC = citotoxicidad dependiente del fármaco-anticuerpo; mAb = anticuerpo monoclonal; NK = asesina natural.

Figura 16A-D. Evaluación de la Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos mediada por Células Asesinas Naturales de OX40mAb24, Experimento 4. (16A-B) Exterminio
10 específico de células T CD4 humanas que expresan OX40 mediado por OX40mAb24, utilizando células NK humanas primarias de dos donantes separados tal como se indica. (16C-D) Lisis de células Toledo B por parte de células NK de donantes 464 y
15 532 en presencia de rituximab, pero no anticuerpo control del isotipo IgG1 humano R347. Las réplicas técnicas se realizaron por duplicado. Las Barras de errores representan el error típico de la media. ADCC = citotoxicidad dependiente del fármaco-anticuerpo; mAb = anticuerpo monoclonal; NK =
20 asesina natural.

Figura 17A-B. Evaluación de la Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos mediada por Células Asesinas Naturales de OX40mAb24, Experimento 5. Exterminio específico
de células T CD4⁺ humanas que expresan OX40 mediado por
25 OX40mAb24, utilizando células NK humanas primarias de donantes 601 (panel A) y 602 (panel B) tal como se indica. Las Barras de errores representan el error típico de la media. ADCC = citotoxicidad dependiente del fármaco-anticuerpo; mAb = anticuerpo monoclonal; NK = asesina
30 natural.

Figura 18A-B. Evaluación de la unión de OX40mAb24 y 9B12 a proteína C1q humana purificada. Las concentraciones indicadas de proteína C1q humana purificada se inyectaron en el chip biosensor. El blanco representa inyecciones de
5 vehículo PBS/Tween 20 al 0.005% solo. Panel A: Unión de OX40mAb24 a C1q humana purificada. Panel B: Unión de 9B12 a C1q humana purificada.

Figura 19A-B. Actividad de OX40mAb24 en el Clon B2 en Jurkat NFκB-luciferasa que expresa OX40 de Cyno/Rhesus y
10 Ensayos de Bioactividad de Células B de Rhesus LCL8664. Inducción dependiente de la concentración de la actividad de NFκB por parte de OX40mAb24 (en RLU) en una línea de células informadoras Jurkat NFκB-luciferasa que expresan OX40 de
15 cyno/rhesus combinada con la línea de células B de rhesus LCL8664. Datos mostrados para 2 ensayos independientes con 4 réplicas para cada uno de los puntos de datos. Las barras de errores que representan el error típico de la media no son visibles debido a la escala. RLU = unidades de luz
relativas.

20 Figura 20A-B. Actividad de 9B12 en el Clon B2 en Jurkat NFκ-luciferasa que expresa OX40 de Cyno/Rhesus y Ensayos de Bioactividad de Células B de Rhesus LCL8664. Inducción dependiente de la concentración de la actividad de NFκB por
25 parte de 9B12 (en RLU) en una línea de células informadoras Jurkat NFκB-luciferasa que expresan OX40 de cyno/rhesus combinada con la línea de células B de rhesus LCL8664. Datos mostrados para 2 ensayos independientes con 4 réplicas para
30 cada uno de los puntos de datos. Las Barras de errores representan el error típico de la media. RLU = unidades de luz relativas.

Figura 21A-B. Actividad de OX40mAb24 y 9B12 en el Clon B2 en Jurkat NFκ-luciferasa que expresa OX40 de Cyno/Rhesus y Ensayos de Bioactividad de Células Inmunes de Rhesus que expresan el Receptor Fc Gamma. Inducción dependiente de la
5 concentración de la actividad de NFκB por parte de OX40mAb24 (Panel A) y 9B12 (Panel B)(en RLU) en una línea de células informadoras Jurkat NFκB-luciferasa que expresan OX40 de cyno/rhesus combinada con la línea de células inmunes de rhesus que expresan el receptor Fcγ. Dos réplicas por cada
10 punto de datos. RLU = unidades de luz relativas.

Figura 22A-D. OX40mAb24 y 9B12 Provocan la Proliferación de Células T CD4 de Rhesus Primarias. OX40mAb24 (22A-B) y 9B12 (22C-D) inducían la división celular en
15 células CD4⁺ de rhesus activadas primarias. Los datos se muestran para 2 ensayos independientes con pocillos por triplicado. Las Barras de errores representan el error típico de la media.

Figura 23A-B. Efecto de OX40mAb24 y 9B12 sobre el Crecimiento de Células A375 en un Modelo de Xenoinjerto de
20 Ratón - Experimento 1. Se sometieron a injerto seis ratones NOD/SCID en cada uno de los grupos por vía SC en el día 1 con células A375 mezcladas con líneas de células T CD4⁺ y CD8⁺ alorreactivas humanas a una relación E:T de 1:6. OX40mAb24 (23A) y 9B12 (23B) y el control del isotipo (23A-
25 B) se administraron por vía IP los Días 3, 5, 7, 10 y 12. Se muestran los valores medios de volúmenes tumorales. Una comparación entre los animales tratados con OX40mAb24 (23A) o tratados con 9B12 (23B) y los animales tratados con control del isotipo se realizó los Días 25 y 18, respectivamente, y
30 se analizaron las diferencias entre grupos en cuanto a la significancia estadística mediante un test de suma de rangos

de Mann-Whitney. Las Barras de errores representan el error típico de la media. *: TGI > 68%, $P \leq 0.05$ según se compara con el grupo control del isotipo. E:T = relación efector-a-diana; IP intraperitoneal; NOD/SCID = inmunodeficiente combinado con diabético no obeso/grave; SC = subcutánea; TGI = inhibición del crecimiento del tumor.

Figura 24A-B. Efecto de OX40mAb24 y 9B12 sobre el Crecimiento de Células A375 en un Modelo de Xenoinjerto de Ratón - Experimento 2. Se sometieron a injerto seis ratones NOD/SCID en cada uno de los grupos por vía SC en el Día 1 con células A375 mezcladas con líneas de células T CD4⁺ y CD8⁺ alorreactivas humanas a una relación E:T de 1:6. OX40mAb24 (24A) y 9B12 (24B) y el control del isotipo (24A-B) se administraron por vía IP los Días 3, 5, 7, 10 y 12. Se muestran los valores medios de volúmenes tumorales. Una comparación entre los animales tratados con OX40mAb24 (12A) o tratados con 9B12 (12B) y los animales tratados con control del isotipo se realizó el Día 18, y se analizaron las diferencias entre grupos en cuanto a la significancia estadística mediante un test de suma de rangos de Mann-Whitney. Las Barras de errores representan el error típico de la media. #: TGI > 75%, $P < 0.0004$ según se compara con el grupo control del isotipo. *: TGI = 53%, $P \leq 0.05$ según se compara con el grupo control del isotipo. E:T = relación efector-a-diana; IP intraperitoneal; NOD/SCID = inmunodeficiente combinado con diabético no obeso/grave; SC = subcutánea; TGI = inhibición del crecimiento del tumor.

Figura 25. Efecto de OX40mAb24 sobre el Crecimiento de Células A375 en un Modelo de Xenoinjerto de Ratón - Experimento 3. Se sometieron a injerto seis ratones NOD/SCID en cada uno de los grupo por vía SC en el Día 1 con células

A375 mezcladas con líneas de células T CD4⁺ y CD8⁺ alorreactivas humanas a una relación E:T de 1:6. OX40mAb24 se administró IP los Días 3, 6, 8, 10 y 13. Se muestran los valores medios de volúmenes tumorales. Una comparación entre los animales tratados con OX40mAb24 y los animales tratados con control del isotipo se realizó el Día 28, y se analizaron las diferencias entre grupos en cuanto a la significancia estadística mediante un test de suma de rangos de Mann-Whitney. Las Barras de errores representan el error típico de la media. *: TGI = 75%, $P \leq 0.05$ comparado con el grupo control del isotipo; E:T = relación efector-a-diana; IP intraperitoneal; NOD/SCID = inmunodeficiente combinado con diabético no obeso/grave; SC = subcutánea; TGI = inhibición del crecimiento del tumor.

Figura 26A-B. Efecto de OX86 mIgG2a sobre el Crecimiento de Células CT25 en un Modelo Singeneico de Ratón. Se inocularon diez ratones BALB/c en cada uno de los grupos por vía SC en el Día 1 con células CT26. Control (control negativo) y artículo de ensayo (OX86 mIgG2a) se administraron por vía IP en los Días 9 y 12 (flechas en (26A)). Se muestran los valores de la media (26A) e individuales (26B) de los volúmenes de los tumores. Se realizó una comparación entre los animales tratados con OX86 mIgG2a y los animales tratados con control negativo se realizó y se analizaron las diferencias entre grupos en cuanto a la significancia estadística mediante ANOVA de una vía utilizando el software GraphPad Prism 6.0. Las Barras de errores representan el error típico de la media. *: TGI > 50%, $P \leq 0.0001$ según se compara con el grupo control del isotipo el Día 21. IP = intraperitoneal; SC = subcutánea; TGI = inhibición del crecimiento del tumor.

Figura 27A-B. Efecto de OX86 mIgG2a sobre el Crecimiento de Células CT26 en un Modelo Singeneico de Ratón. Se inocularon doce ratones BALB/c en cada uno de los grupos por vía SC en el Día 1 con células CT26. El artículo de ensayo (OX86 mIgG2a) se administró por vía IP en los Días 13 y 16 (flechas en (27A)). Se muestran los valores de la media (27A) e individuales (27B) de los volúmenes de los tumores. Se realizó una comparación entre los animales tratados con OX86 mIgG2a y los animales control no tratados se realizó y se analizaron las diferencias entre grupos en cuanto a la significancia estadística mediante ANOVA de una vía utilizando el software GraphPad Prism 6.0. Las Barras de errores representan el error típico de la media. *: TGI > 50%, $P \leq 0.0001$ según se compara con el grupo control no tratado el Día 24. IP = intraperitoneal; SC = subcutánea; TGI = inhibición del crecimiento del tumor.

Figura 28A-B. Efecto de OX86 mIgG2a sobre el Crecimiento de Células MCA205 en un Modelo Singeneico de Ratón. Se inocularon catorce ratones C57BL/6 en cada uno de los grupos por vía SC en el Día 1 con células MCA205. Artículo control (control del isotipo) y artículo de ensayo (OX86 mIgG2a) se administraron por vía IP en los Días 11 y 14. Se muestran los valores de la media (28A) e individuales (28B) de los volúmenes de los tumores. Se realizó una comparación entre los animales tratados con OX86 mIgG2a y los animales tratados con control del isotipo y se analizaron las diferencias entre grupos en cuanto a la significancia estadística mediante ANOVA de una vía utilizando el software GraphPad Prism 6.0. Las Barras de errores representan el error típico de la media. *: TGI > 50%, $P \leq 0.0001$ según se compara con el

grupo control del isotipo el Día 27. IP = intraperitoneal; SC = subcutánea; TGI = inhibición del crecimiento del tumor.

Figura 29A-B. Efecto de OX86 mIgG2a sobre el Crecimiento de la Línea de Células 4T1 en un Modelo Singeneico de Ratón.

5 Se inocularon doce ratones BALB/c en cada uno de los grupos por vía SC en el Día 1 con células 4T1. Artículo control (control del isotipo) y artículo de ensayo (OX86 mIgG2a) se administraron por vía IP en los Días 13, 16, 20 y 23. Se muestran los valores de la media (29A) e individuales (29B)
10 de los volúmenes de los tumores. Se realizó una comparación entre los animales tratados con OX86 mIgG2a y los animales tratados con control del isotipo y se analizaron las diferencias entre grupos en cuanto a la significancia estadística mediante ANOVA de una vía utilizando el software
15 GraphPad Prism 6.0. Las Barras de errores representan el error típico de la media. IP = intraperitoneal; SC = subcutánea; TGI = inhibición del crecimiento del tumor.

Figura 30. Alineamiento de Aminoácidos del Dominio Extracelular de moléculas de OX40 Humanas y de Ratón. OX40
20 humano (secuencia de referencia de NCBI NP_003318.1) comparte un 60% de la identidad de la secuencia con OX40 de ratón (secuencia de referencia de NCBI NP_035789.1). El alineamiento se realizó utilizando el método de Clustal W. Se detallan los dominios extracelulares de OX40. Los
25 aminoácidos que difieren entre ser humano y ratón en el dominio CRD3 se muestran con flechas. Los dos residuos del epítipo críticos L116 y A126 están encuadrados. CRD = dominio rico en cisteína.

Figura 31. Nomenclatura y Representación Esquemática de
30 Variantes de OX40 Humanas/Ratón Quiméricas. Se construyeron variantes de OX40 humanas/ratón quiméricas intercambiando

diversos dominios o residuos de OX40 de ratón (en blanco) en humano (en negro) (K0) o de aminoácidos de OX40 humano en OX40 de ratón (KI). Las mutaciones para aminoácidos individuales o combinaciones se mostraron con una flecha roja (K0) y verde (KI). CRD = dominio rico en cisteína; KI = activado; K0 = inactivado; TM = dominio de transmembrana.

Figura 32A-C. Análisis FACS de la Unión de OX40mAb24 a Variantes de OX40 Humanas/Ratón Quiméricas. Todas las variantes se expresaron de forma transitoria utilizando células 293F para la caracterización de la unión con análisis FACS utilizando OX40mAb24 y su mAb de ratón parental, 9B12. Los niveles de expresión se vigilaron utilizando anticuerpos policlonales OX40 anti-humanos y de ratón. (A) Utilizando variantes quiméricas intercambiadas en el dominio, el dominio CRD3 se identificó como el dominio que contiene el epítipo. OX40mAb24 y 9B12 no se unen a las variantes K0 que codifican el dominio CRD3 de ratón (K0_CRD3 y K0_CRD3+4), y reconocen la variante KI (KI_CRD3) que codifica el dominio CRD3 humano. (B) Adicionalmente, residuos de epítopos críticos se determinaron como L116 y A126 en el dominio CRD3 al mutar aminoácidos individuales o combinaciones de aminoácidos que difieren entre humanos y de ratón en el dominio CRD3 (Figura 11-1). La unión de OX40mAb24 y 9B12 se abolió cuando se reemplazan los residuos humanos L116 y A126 por los homólogos de ratón (K0_L116+A126). (C) Las variantes KI/ganancia-de-función confirman la importancia de estos dos residuos críticos. El injerto de L116, A126 o la combinación a OX40 de ratón condujo a la unión de OX40mAb24 y 9B12.

Figura 33A-D. Niveles de expresión de Ki67 e ICOS sobre células T CD4⁺ de la Sangre Periférica y Esplénicas de OX86 mIgG2a a Ratones Naif. Siete ratones BALB/c naif en cada

uno de los grupos fueron inoculados por vía intraperitoneal el Día 1 con artículos de control (solución salina y control del isotipo NIP228 IgG2a) y artículo de ensayo (OX86 mIgG2a) a los niveles de dosis indicados. Se tomó sangre (paneles A y C) los Días indicados y se aislaron los bazos de cinco grupos el Día 10. Los niveles de expresión de Ki67 (paneles A y B) e ICOS (paneles C y D) en células T CD4⁺ se midieron mediante citometría de flujo. Para cada uno de los grupos se muestran los valores medios del porcentaje de células CD4 en sangre que expresan Ki67 (panel A) e ICOS (panel C). Para cada uno de los animales de grupos individuales se representó el porcentaje de células CD4 en el bazo que expresan Ki67 (panel A) e ICOS (panel D). Las Barras de errores representan el error típico de la media. *: $P \leq 0.05$ están marcados en los Paneles A y C; los valores de P están enumerados para cada uno de los grupos con significancia en los Paneles B y D.

Figura 34A-B. Correlación de la Expresión de Ki67 e ICOS en células T CD4⁺ de la Sangre Periférica y Esplénicas tras la Administración de OX86 mIgG2a a Ratones Naif. Se realizó una comparación entre el porcentaje de Ki67 e ICOS en células T CD4 positivas aisladas de la sangre periférica (panel A) y los bazos (panel B) de animales individuales mostrados en la Figura 12-1 10 días después del tratamiento con artículos control (solución salina y control del isotipo NIP228 IgG2a) y artículo de ensayo (OX86 mIgG2a) a los niveles de dosis indicados. Se representaron las mediciones para ratones individuales. El análisis de regresión lineal se realizó utilizando el software GraphPad Prism 6.0 en el grupo resultante de conjuntos de datos para determinar la línea de mejor ajuste para los datos. Para cada uno de los

gráficos se proporcionan el coeficiente de determinación (r^2) y la significancia de que la curva es no cero (valor P).

Figura 35A-D. Niveles de expresión de Ki67 e ICOS sobre
5 células T CD8⁺ de la Sangre Periférica y Esplénicas tras la
Administración de OX86 mIgG2a a Ratones Naif. Siete ratones
BALB/c naif en cada uno de los grupos fueron inoculados por
vía intraperitoneal el Día 1 con artículos de control
(solución salina y control del isotipo NIP228 IgG2a) y
10 artículo de ensayo (OX86 mIgG2a) a los niveles de dosis
indicados. Se tomó sangre (paneles A y C) los Días indicados
y se aislaron los bazo de cinco grupos el Día 10. Los
niveles de expresión de Ki67 (paneles A y B) e ICOS (paneles
C y D) en células T CD8⁺ se midieron mediante citometría de
15 flujo. Para cada uno de los grupos se muestran los valores
medios del porcentaje de células CD8 en sangre que expresan
Ki67 (panel A) e ICOS (panel C). Para cada uno de los animales
de grupos individuales se representó el porcentaje de células
CD8 en el bazo que expresan Ki67 (panel A) e ICOS (panel D).
20 Las Barras de errores representan el error típico de la
media. *: $P \leq 0.05$ están marcados en los Paneles A y C; los
valores de P están enumerados para cada uno de los grupos
con significancia en los Paneles B y D.

Figura 36A-B. Correlación de la Expresión de Ki67 e
25 ICOS en células T CD8⁺ de la Sangre Periférica y Esplénicas
tras la Administración de OX86 mIgG2a a Ratones Naif. Se
realizó una comparación entre el porcentaje de Ki67 e ICOS
en células T CD8⁺ positivas aisladas de la sangre periférica
(panel A) y los bazo (panel B) de animales individuales
30 mostrados en la Figura 12-1 10 días después del tratamiento
con artículos control (solución salina y control del isotipo

NIP228 IgG2a) y artículo de ensayo (OX86 mIgG2a) a los niveles de dosis indicados. Se representaron las mediciones para ratones individuales. El análisis de regresión lineal se realizó utilizando el software GraphPad Prism 6.0 en el grupo resultante de conjuntos de datos para determinar la línea de mejor ajuste para los datos. Para cada uno de los gráficos se proporcionan el coeficiente de determinación (r^2) y la significancia de que la curva es no cero (valor P).

Figura 37A-D. Efecto de OX86 IgG2a de Ratón sobre el Crecimiento de la Línea de Células CT26 en el Modelo de Ratón Singeneico que Carece de Receptores Fc Gamma Inhibidores (Fcgr2b-/-) o Activantes (Fcer1g-/-). Grupos de ocho ratones BALB/c modificados genéticamente para que carecieran del receptor inhibidor Fc γ IIb (Fcgr2b-/-; paneles A y B) o de los receptores activantes Fc γ (Fcer1g-/-; paneles C and D) se inocularon por vía SC el Día 1 con células CT26. Artículos control (control solución salina/no tratado y mutante OX86 mIgG1 D265A/control del isotipo) y artículo de ensayo (OX86 mIgG2a) se administraron por vía IP en los Días 4 y 7. Se muestran los volúmenes medios (paneles A y C) e individuales (paneles B y D) de los tumores. Se realizó una comparación entre los animales tratados con OX86 mIgG2a y los animales no tratados y tratados con control del isotipo y se analizaron las diferencias entre grupos en cuanto a la significancia estadística mediante ANOVA de una vía utilizando el software GraphPad Prism 6.0. Las Barras de errores representan el error típico de la media. SC = subcutánea; IP = intraperitoneal; TGI = inhibición del crecimiento del tumor.

Figura 38A-D. Efecto de OX86 IgG2a de Ratón sobre el Crecimiento de la Línea de Células MCA205 en un Modelo de Ratón Singeneico que Carece de Receptores Fc Gamma Inhibidores (Fcgr2b-/-) o Activantes (Fcer1g-/-). Grupos de
5 ocho ratones C57BL/6 mutados genéticamente para que carecieran del receptor inhibidor Fc γ IIb (Fcgr2b-/-; paneles A y B) o de los receptores activantes Fc γ (Fcer1g-/-; paneles C and D) se inocularon por vía SC el Día 1 con células MCA205. Artículos control (control solución
10 salina/no tratado y mutante OX86 mIgG1 D265A/control del isotipo) y artículo de ensayo (mOX40L FP) se administraron por vía IP en los Días 4 y 7. Se muestran los volúmenes medios (paneles A y C) e individuales (paneles B y D) de los tumores. Se realizó una comparación entre los animales
15 tratados con mOX40L FP y los animales no tratados y tratados con control del isotipo y se analizaron las diferencias entre grupos en cuanto a la significancia estadística mediante ANOVA de una vía utilizando el software GraphPad Prism 6.0. Las Barras de errores representan el error típico de la
20 media. *: TGI $\geq$ 95%, $P \leq 0.023$ según se compara con el grupo control del isotipo el día 20. SC = subcutánea; IP = intraperitoneal; TGI = inhibición del crecimiento del tumor.

Figura 39A-B. Niveles de expresión de Ki67 en células T CD4⁺ Aisladas de la Sangre Periférica, del Bazo y Tumores
25 CT26 tras la Administración de OX86 IgG2a de Ratón a Ratones que Carecen de Receptores Fc Gamma Inhibidores (Fcgr2b-/-) o Activantes (Fcer1g-/-). Grupos de cuatro ratones BALB/c modificados genéticamente para que carecieran del receptor inhibidor Fc γ IIb (Fcgr2b-/-; paneles A) o de los receptores
30 activantes Fc γ (Fcer1g-/-; paneles B) se inocularon por vía SC el Día 1 con células CT26, pero se realizó de manera

similar al estudio presentado en la Figura 12-5. Artículos control (control solución salina/no tratado y mutante OX86 mIgG1 D265A/control del isotipo) y artículo de ensayo (OX86 mIgG2a) se administraron por vía IP en los Días 4 y 7. 5 Sangre, bazo y tumores se aislaron el Día 14 para el panel A y el Día 13 para el panel B. Los niveles de expresión de Ki67 en células T CD4⁺ se midieron mediante citometría de flujo. Los símbolos representan el porcentaje de Ki67 en células T CD4⁺ positivas de cada uno de los tejidos de ratones 10 individuales; la barra horizontal representa los valores medios para cada uno de los grupos. Las diferencias entre grupos se analizaron en cuanto a la significancia estadística mediante ANOVA de una vía utilizando el software GraphPad Prism 6.0, y se indican con una barra horizontal con los 15 valores de P calculados. SC = subcutánea; IP = intraperitoneal

Figura 40A-B. Niveles de expresión de Ki67 en células T CD8⁺ Aisladas de la Sangre Periférica, del Bazo y Tumores CT26 tras la Administración de OX86 IgG2a de Ratón a Ratones 20 que Carecen de Receptores Fc Gamma Inhibidores (Fcgr2b-/-) o Activantes (Fcer1g-/-). Grupos de cuatro ratones BALB/c modificados genéticamente para que carecieran del receptor inhibidor Fc γ IIb (Fcgr2b-/-; paneles A) o de los receptores activantes Fc γ (Fcer1g-/-; paneles B) se inocularon por vía 25 SC el Día 1 con células CT26; este estudio es independiente de, pero se realizó de manera similar al estudio presentado en la Figura 12-5. Artículos control (solución salina/no tratado y mutante OX86 mIgG1 D265A/control del isotipo) y artículo de ensayo (OX86 mIgG2a) se administraron por vía 30 en los Días 4 y 7. Sangre, bazo y tumores se aislaron el Día 14 para el panel A y el Día 13 para el panel B. Los

niveles de expresión de Ki67 en células T CD8⁺ se midieron mediante citometría de flujo. Los símbolos representan el porcentaje de Ki67 en células T CD8⁺ positivas de cada uno de los tejidos de ratones individuales; la barra horizontal representa los valores medios. Las diferencias entre grupos se analizaron en cuanto a la significancia estadística mediante ANOVA de una vía utilizando el software GraphPad Prism 6.0, y se indican con una barra horizontal con los valores de P calculados. SC = subcutánea; IP = intraperitoneal

Figura 41A-B. Niveles de expresión de Ki67 en células T CD4 Aisladas de los Ganglios Linfáticos de Drenaje, del Bazo y Tumores MCA205 tras la Administración de OX86 IgG2a de Ratón a Ratones que Carecen de Receptores Fc Gamma Inhibidores (Fcgr2b^{-/-}) o Activantes (Fcer1g^{-/-}). Grupos de cuatro ratones C57BL/6 modificados genéticamente para que carecieran del receptor inhibidor Fcγ IIb (Fcgr2b^{-/-}; paneles A) o de los receptores activantes Fcγ (Fcer1g^{-/-}; paneles B) se inocularon por vía SC el Día 1 con células MCA205; este estudio es independiente de, pero se realizó de manera similar al estudio presentado en la Figura 12-6. Artículos control (solución salina/no tratado y mutante OX86 mIgG1 D265A/control del isotipo) y artículo de ensayo (OX86 mIgG2a) se administraron por vía IP en los Días 4 y 7. Ganglios linfáticos, bazo y tumores se aislaron el Día 20 para el panel B. Los niveles de expresión de Ki67 en células T CD4⁺ se midieron mediante citometría de flujo. Los símbolos representan el porcentaje de Ki67 en células T CD4⁺ positivas de cada uno de los tejidos de ratones individuales; la barra horizontal representa los valores medios. Las diferencias entre grupos se analizaron en cuanto a la significancia

estadística mediante ANOVA de una vía utilizando el software GraphPad Prism 6.0, y se indican con una barra horizontal con los valores de P calculados. SC = subcutánea; IP = intraperitoneal

5 Figura 42A-B. Niveles de expresión de Ki67 en células T CD8 Aisladas de los Ganglios Linfáticos de Drenaje, del Bazo y Tumores MCA205 tras la Administración de OX86 IgG2a de Ratón a Ratones que Carecen de Receptores Fc Gamma Inhibidores (Fcgr2b-/-) o Activantes (Fcer1g-/-). Grupos de
10 cuatro ratones C57BL/6 modificados genéticamente para que carecieran del receptor inhibidor Fc γ IIb (Fcgr2b-/-; paneles A) o de los receptores activantes Fc γ (Fcer1g-/-; paneles B) se inocularon por vía SC el Día 1 con células MCA205; este estudio es independiente de, pero se realizó de
15 manera similar al estudio presentado en la Figura 12-6. Artículos control (solución salina y control mutante mOX40L FP D265A) y artículo de ensayo (OX86 mIgG2a) se administraron por vía IP en los Días 4 y 7. Los ganglios linfáticos de drenaje, los bazo y el tumor se aislaron el Día 20. Los
20 niveles de expresión de Ki67 en células T CD8⁺ se midieron mediante citometría de flujo. Los símbolos representan el porcentaje de Ki67 en células T CD8⁺ positivas de cada uno de los tejidos de ratones individuales; la barra horizontal representa los valores medios. Las diferencias entre grupos
25 se analizaron en cuanto a la significancia estadística mediante ANOVA de una vía utilizando el software GraphPad Prism 6.0, y se indican con una barra horizontal con los valores de P calculados. SC = subcutánea; IP = intraperitoneal

30 Figura 43A-B. Reducción de Células T Reguladoras mediante OX40mAb24. Panel A: Porcentajes de células

CD4⁺Foxp3⁺ Treg humanas medidos en la sangre periférica de ratones a los que se injertaron células inmunes humanas junto antes de la inmunización con KLH y el tratamiento con NIP228 huIgG1 control (huIgG1) u OX40mAb24. Sin mAb indica sin
5 inmunización y sin tratamiento con mAb. Panel B: Porcentajes de células CD4⁺Foxp3⁺ Treg humanas medidos en la sangre periférica de ratones en los mismos grupos después de inmunización y tratamiento con mAbs. Los valores p estadísticos son de ANOVA de una vía. Hu = humano; mAb =
10 anticuerpo monoclonal; Treg = células T reguladoras

Figura 44A-D. Expansión de Células T CD4 Efectoras y de la Memoria con Respecto a Células T Reguladoras después de Tratamiento con OX40mAb24. Relaciones de células T CD4⁺ humanas a células Treg humanas en la sangre periférica de
15 ratones a los que se injertaron células inmunes humanas ya sea con pre-tratamiento (izquierda) o post-tratamiento (derecha) con inmunización con KLH seguido del mAb NIP228 huIgG1 (huIgG1) u OX40mAb24, tal como se indica, para células T CD4⁺ Totales (Panel A); CD4⁺ efectoras (Teff) (Panel B);
20 CD4⁺ de la memoria efectoras (Tem) (Panel C); y CD4⁺ de la memoria centrales (Tcm) (Panel D). Sin mAb indica sin inmunización, así como sin tratamiento con mAb. Los valores p estadísticos son de ANOVA de una vía. Hu = humano; mAb = anticuerpo monoclonal; Tcm = células T de la memoria
25 centrales; Teff = células T efectoras; Tem = células T de la memoria efectoras

Figuras 45A-B. Relación Incrementada de Células T CD8⁺ Efectoras a Reguladoras en Ratones Tratados con OX40mAb24. Relaciones de células T CD8⁺ humanas a células Treg humanas
30 en la sangre periférica de ratones a los que se injertaron células inmunes humanas ya sea con pre-tratamiento

(izquierda) o post-tratamiento (derecha) con inmunización con KLH seguido del mAb NIP228 huIgG1 (huIgG1) u OX40mAb24, tal como se indica. Sin mAb indica sin inmunización, así como sin tratamiento con mAb. Se indican los valores p estadísticos de ANOVA de una vía comparando todos los grupos. Hu = humano; mAb = anticuerpo monoclonal; Teff = células T efectoras; Treg = células T reguladoras

Figuras 46A-C. Niveles Incrementados de CD25 (Receptor de IL-2) en Células T CD8⁺ Efectoras a Reguladoras en Ratones Tratados con OX40mAb24. Porcentaje de células positivas de CD25 (receptor de IL-2) entre células T CD8⁺ humanas en la sangre periférica de ratones a los que se injertaron células inmunes humanas ya sea con pre-tratamiento (izquierda) o post-tratamiento (derecha) o sin tratamiento (sin mAb), o inmunización con KLH seguido del mAb NIP228 huIgG1 (huIgG1) u OX40mAb24, tal como se indica, para (A) células T CD8⁺ Totales; (B) CD8⁺ efectoras (Teff); (C) CD8⁺ de la memoria efectoras (Tem). Sin mAb indica sin inmunización, así como sin tratamiento con mAb. Los valores p estadísticos son de ANOVA de una vía. Hu = humano; mAb = anticuerpo monoclonal; Teff = células T efectoras; Tem = células T de la memoria efectoras.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La implicación del receptor OX40 en células T, *p. ej.*, células T CD4⁺ durante o poco después del cebado por parte de un antígeno resulta en una respuesta incrementada de las células T, *p. ej.*, células T CD4⁺ al antígeno. En el contexto de la presente divulgación, el término "implicación" se refiere a la unión y a la estimulación de al menos una actividad mediada por el receptor OX40. Por ejemplo, la implicación del receptor OX40 en células T específicas para

el antígeno, *p. ej.*, células T CD4⁺ puede resultar en una proliferación incrementada de células T en comparación con la respuesta al antígeno solo, y en una producción incrementada de citoquinas. Se puede mantener la respuesta elevada al antígeno durante un periodo de tiempo sustancialmente más largo que en ausencia de implicación del receptor OX40. Por lo tanto, la estimulación a través del receptor OX40 potencia la respuesta inmune específica al reforzar el reconocimiento de células T de antígenos, *p.ej.*, antígenos de tumores.

Agonistas de OX40 pueden potenciar las respuestas inmunes específicas para los antígenos en un sujeto, cuando se administran al sujeto durante o poco después del cebado de células T por parte de un antígeno. Los agonistas de OX40 incluyen el ligando de OX40 ("OX40L"), tal como proteínas de fusión de OX40L solubles y anticuerpos anti-OX40 o fragmentos de los mismos. Un ejemplo específico es un anticuerpo humanizado que se une específicamente a OX40, desencadenando con ello la señalización. Mediante esta descripción se proporciona una colección de anticuerpos monoclonales anti-OX40 humanizados. También se describen ácidos nucleicos que incluyen secuencias de polinucleótidos que codifican este tipo de anticuerpos. Esta descripción también proporciona métodos para potenciar una respuesta inmune específica para el antígeno en un sujeto utilizando anticuerpos monoclonales anti-OX40 humanizados.

DEFINICIONES

Ha de señalarse el término entidad "un" o "una" se refiere a una o más de esas entidades; por ejemplo, "una molécula de unión" se entiende que representa una o más moléculas de unión. Como tales, los términos "un" (o

"una"), "uno o más", y "al menos uno" pueden utilizarse indistintamente en esta memoria.

Además, "y/o" cuando se usa en esta memoria debe tomarse como la descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por tanto, el término "y/o" tal como se usa en un frase tal como "A y/o B" en esta memoria pretende incluir "A y B", "A o B", "A" (solo), y "B" (solo). De modo similar, se pretende que el término "y/o", según se utiliza en una frase tal como "A, B y/o C", incluya cada una de las siguientes realizaciones: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

A menos que se defina de otro modo, términos y expresiones técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que el que comúnmente se entiende por un experto ordinario en la técnica a la que se refiere esta descripción. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2ª ed., 2002, CRC Press; el Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3ª ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan a un experto un diccionario general de muchos de los términos utilizados en esta descripción.

Las unidades, los prefijos y los símbolos se indican con su forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxi. Los encabezados que se proporcionan en el presente documento

no son limitaciones de los diversos aspectos o aspectos de la descripción, que pueden considerarse por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad. Por consiguiente, los términos y las expresiones definidos inmediatamente a
5 continuación se definen más detalladamente por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión sustancia, composición, entidad y/o cualquier combinación de sustancias, composiciones o entidades "que no se produce de
10 forma natural", o cualesquiera variantes gramaticales de las mismas, es una expresión condicional que excluye de manera explícita, pero solo excluye las formas de sustancia, composición, entidad y/o cualquier combinación de sustancias, composiciones o entidades que son o que pueden
15 ser determinadas o interpretadas en cualquier momento por un juez o una entidad administrativa o judicial como "que se produce de forma natural".

Tal como se usa en esta memoria, se pretende que el término "polipéptido" abarque un "polipéptido" singular, así
20 como el plural "polipéptidos", y se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) unida linealmente mediante enlaces amida (conocidos también como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y no se refiere
25 a una longitud específica del producto. De esta manera, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteínas", "cadena de aminoácidos", o cualquier otro término o expresión utilizado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos se incluyen en la definición
30 de "polipéptido", y el término "polipéptido" se puede usar en vez de, o de forma indistinta con cualquiera de estos

términos. El término "polipéptido" también pretende referirse a los productos de modificaciones post-expresión del polipéptido, que incluyen sin limitación, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación y derivatización mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica o modificación por cualesquiera aminoácidos que no se producen de forma natural. Un polipéptido se puede derivar de una fuente biológica o se puede producir por tecnología recombinante, pero no necesariamente se traduce a partir de una secuencia de ácidos nucleicos designada. Un polipéptido se puede generar de cualquier forma, incluida la síntesis química.

Un polipéptido como se divulga en esta memoria puede ser de un tamaño de aproximadamente 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1.000 o más, o 2.000 o más aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, aunque no necesariamente tienen dicha estructura. A los polipéptidos con una estructura tridimensional definida se les alude como plegados, y a los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, sino que pueden adoptar un gran número de diferentes conformaciones, se les alude como no plegados. Tal como se utiliza en esta memoria, el término glicoproteína se refiere a una *proteína* acoplada a al menos un resto hidrato de carbono que está unido a la proteína a través de una cadena lateral con contenido en oxígeno o con contenido en nitrógeno de un aminoácido, *p. ej.*, una serina o una asparagina.

Por un polipéptido "aislado" o un fragmento, variante, o derivado del mismo se entiende un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere un nivel concreto de

purificación. Por ejemplo, se puede retirar un polipéptido aislado de su entorno nativo o natural. Polipéptidos y proteínas producidos de forma recombinante, expresados en células huéspedes, se consideran aislados tal como se describen en esta memoria, ya que son polipéptidos nativos o recombinantes que han sido separados, fraccionados o parcial o sustancialmente purificados por cualquier técnica adecuada.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término polipéptido "que no se produce de forma natural", o cualesquiera variantes gramaticales del mismo, es un término condicional que excluye de manera explícita, pero solo excluye las formas del polipéptido que son o que pueden ser determinadas o interpretadas en cualquier momento por un juez o una entidad administrativa o judicial como "que se produce de forma natural".

Otros polipéptidos divulgados en el presente documento son fragmentos, derivados, análogos o variantes de los péptidos anteriores, y cualquier combinación de estos. Los términos "fragmento", "variante", "derivado" y "análogo", tal como se describen en esta memoria, incluyen cualesquiera polipéptidos que conservan al menos alguna de las propiedades del anticuerpo o polipéptido nativo correspondiente, por ejemplo unirse específicamente a un antígeno. Fragmentos de polipéptidos incluyen, por ejemplo, fragmentos proteolíticos, así como fragmentos de delección, además de fragmentos de anticuerpos específicos comentados en otra parte en esta memoria. Variantes de, *p.ej.*, un polipéptido incluyen fragmentos tal como se describen arriba, y también polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas debido a sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos.

En determinados aspectos, las variantes pueden ser que no se producen de forma natural. Las variantes que se producen de forma no natural se pueden producir mediante técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica. Las variantes polipeptídicas pueden comprender sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras. Los derivados son polipéptidos que han sido alterados con el fin de exhibir características adicionales que no se encuentran en el polipéptido original. Ejemplos incluyen proteínas de fusión. Las variantes de polipéptidos pueden también denominarse en esta memoria como "análogos de polipéptidos". Tal como se utiliza en esta memoria, a un "derivado" de un polipéptido también se le puede aludir como un polipéptido objeto que tiene uno o más aminoácidos químicamente derivatizados por reacción de un grupo lateral funcional. También incluidos como "derivados" son aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de los veinte aminoácidos convencionales. Por ejemplo, 4-hidroxiprolina puede sustituirse por prolina; 5-hidroxisilisina puede sustituirse por lisina; 3-metilhistidina puede sustituirse por histidina; homoserina puede sustituirse por serina; y ornitina puede sustituirse por lisina.

Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es aquella en donde un aminoácido se reemplaza por otro aminoácido que tiene una cadena secundaria similar. Se han definido en la técnica familias de aminoácidos que tienen cadenas secundarias similares, incluyendo cadenas secundarias básicas (*p.ej.*, lisina, arginina, histidina), cadenas secundarias ácidas (*p.ej.*, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (*p.ej.*, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina,

cisteína), cadenas secundarias no polares (*p.ej.*, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas secundarias beta-ramificadas (*p.ej.*, treonina, valina, isoleucina) y cadenas secundarias aromáticas (*p.ej.*, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservadora. En determinadas realizaciones, sustituciones conservadoras en las secuencias de los polipéptidos y anticuerpos de la presente descripción no derogan la unión del polipéptido o anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos al antígeno al que se une la molécula de unión. Métodos de identificar sustituciones conservadoras de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión al antígeno son bien conocidos en la técnica (véase, *p.ej.*, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32: 1180-1 187 (1993); Kobayashi *et al.*, *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); y Burks *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:.412-417 (1997)).

El término "polinucleótido" pretende abarcar un ácido nucleico singular, así como plurales ácidos nucleicos y se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, *p.ej.*, ARN mensajero (ARNm), ADNc o ADN plasmídico (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (*p.ej.*, un enlace amida, tal como se encuentra en los ácidos nucleicos peptídicos (ANP)). Las expresiones "ácido nucleico" o "secuencia de ácidos nucleicos" se refieren a uno cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, *p.ej.*, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido.

Por un ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se entiende cualquier forma del ácido nucleico o polinucleótido

que está separada de su entorno nativo. Por ejemplo, polinucleótido purificado en gel, o un polinucleótido que codifica un polipéptido contenido en un vector se consideraría que sería "aislado". También, un segmento de polinucleótido, *p.ej.*, un producto de la PCR, que ha sido modificado para tener sitios de restricción para la clonación se considera que está "aislado". Ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huéspedes heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en una disolución no nativa tal como un tampón o solución salina. Moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos, en que el transcrito no es uno que se encuentre en la naturaleza. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados incluyen además las mencionadas moléculas producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador tal como un promotor, un sitio de unión a ribosoma, o un terminador de la transcripción.

Tal como se utiliza en esta memoria, un polinucleótido "que no se produce de forma natural", o cualesquiera variantes gramaticales del mismo, es una definición condicional que excluye de manera explícita, pero solo excluye las formas del polipéptido que son o que pueden ser determinadas o interpretadas en cualquier momento por un juez o una entidad administrativa o judicial como "que se produce de forma natural".

Tal como se utiliza en esta memoria, una "región codificadora" es una porción de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de detención" (TAG, TGA, o TAA) no se traduzca en un aminoácido,

se puede considerar que es parte de una región codificadora, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosoma, terminadores de la transcripción, intrones, y similares, no son parte de una
5 región codificadora. Dos o más regiones codificadoras pueden estar presente en una única construcción de polinucleótido, *p.ej.*, en un único vector, o en construcciones de polinucleótidos diferentes, *p.ej.*, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una
10 única región codificadora, o puede comprender dos o más regiones codificadoras, *p.ej.*, un único vector puede codificar por separado una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina. Además, un vector, polinucleótido
15 o ácido nucleico puede incluir regiones codificadoras heterólogas, ya sea condensadas o no condensadas a otra región codificadora. Regiones codificadoras heterólogas incluyen, sin limitación las que codifican elementos o motivos especializados tales como un péptido señal secretor
20 o un dominio funcional heterólogo.

En determinadas realizaciones, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En el caso del ADN, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido normalmente puede incluir un promotor y/u otros elementos de
25 control de la transcripción o traducción operativamente asociados con una o más regiones codificadoras. Una asociación operativa es cuando una región codificadora de un producto génico, *p.ej.*, un polipéptido, se asocia con una o más secuencias reguladoras de tal manera que dispone la
30 expresión del producto génico bajo la influencia o el control de la o las secuencias reguladoras. Dos fragmentos de ADN

(tal como una región codificadora de polipéptidos y un promotor asociado con la misma) están “operativamente asociados” si la inducción de la función de un promotor resulta en la transcripción de ARNm que codifica el producto
5 génico deseado y si la naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión de dirigir la expresión del producto génico o de interferir con la capacidad del molde de ADN de ser transcrito. De esta
10 manera, una región promotora se asociará operativamente con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor era capaz de efectuar la transcripción de este ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico para las células que dirige la transcripción sustancial del ADN
15 en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores, y señales de terminación de la transcripción, pueden asociarse con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de
20 célula.

Los expertos en la técnica estarán familiarizados con una variedad de regiones control de la transcripción. Éstas incluyen, sin limitación, regiones control de la transcripción que funcionan en células de vertebrados tales
25 como, pero no limitadas a segmentos de promotor y potenciador de citomegalovirus (el promotor temprano inmediato en unión con el intrón A), virus de simio 40 (el promotor temprano) y retrovirus (tales como el virus del sarcoma de Rous). Otras regiones control de la transcripción incluyen las
30 derivadas de genes de vertebrados tales como actina, proteína de choque térmico, hormona del crecimiento bovina y β -globina

de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucarióticas. Las regiones control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejidos así como
5 promotores inducibles por linfocinas (*p. ej.*, promotores inducibles por interferones o interleuquinas).

De forma similar, las personas normalmente expertas en la materia conocen una variedad de elementos control de la traducción. Estos incluyen, pero no de forma limitativa,
10 sitios de unión a ribosomas, codones de inicio y terminación de la traducción, y elementos derivados de picornavirus (concretamente, un sitio de entrada a ribosomas interno, o IRES, denominado también secuencia CITE).

En otras realizaciones, un polinucleótido puede ser
15 ARN, por ejemplo en la forma de ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia o ARN ribosomal.

Regiones codificadoras de polinucleótidos y ácidos nucleicos se pueden asociar con regiones codificadoras adicionales que codifican péptidos secretores o de señal que
20 dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido tal como se describe en esta memoria. De acuerdo con la hipótesis señal, proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido señal o secuencia conductora secretora que es escindido de la proteína madura,
25 una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de la proteína en crecimiento a través del retículo endoplásmico bruto. Los expertos ordinarios en la técnica son conscientes de que polipéptidos secretados por células de vertebrados pueden tener un péptido señal condensado al
30 extremo N del polipéptido, que es escindido del polipéptido completo o de "longitud completa" para producir una forma

secretada o "madura" del polipéptido. En determinadas realizaciones, se usa el péptido señal nativo, *p. ej.*, una cadena pesada de inmunoglobulina o péptido señal de la cadena ligera, o un derivado funcional de esta secuencia que retiene la capacidad de dirigir la secreción del polipéptido que se asocia de manera operativa con este. De forma alternativa, se puede usar un péptido señal de mamífero heterólogo, o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia conductora de tipo salvaje puede ser sustituida por la secuencia conductora de activador tisular de plasminógeno humano (TPA) o β -glucuronidasa de ratón.

Se describen en esta memoria determinadas moléculas de unión, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos. A menos que se refiera específicamente a anticuerpos de tamaño completo, la expresión "molécula de unión" abarca anticuerpos de tamaño completo, así como subunidades de unión a antígenos, fragmentos, variantes, análogos o derivados de tales anticuerpos, *p. ej.*, moléculas de anticuerpo modificadas o fragmentos que se unen a antígeno de una manera similar a moléculas de anticuerpos que utilizan un armazón diferente.

Tal como se utiliza aquí, la expresión "molécula de unión" Se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un receptor, *p. ej.*, un epítipo o un determinante antigénico. Tal como se describe adicionalmente en esta memoria, una molécula de unión puede comprender uno o más "dominios de unión al antígeno" descritos en esta memoria. Un ejemplo no limitante de una molécula de unión es un anticuerpo o fragmento del mismo que conserva la unión específica para el antígeno.

Tal como se utiliza en esta memoria, las expresiones "dominio de unión", "dominio de unión al receptor" o "dominio de unión al antígeno" se refieren a una región de una molécula de unión que es necesaria y suficiente para unirse específicamente a un epítipo. Por ejemplo, un "Fv", *p. ej.*, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de un anticuerpo, ya sea en forma de dos subunidades polipéptidicas separadas o como una cadena sencilla se considera un "dominio de unión". Otros dominios de unión incluyen, sin limitación, una cadena variable pesada (VHH) de un anticuerpo derivada de una especie de camélido, o seis regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de inmunoglobulina expresadas en una estructura heteróloga, *p. ej.*, una línea germinal o especie diferente, o en un armazón diferente, *p. ej.*, un armazón de fibronectina. Una "molécula de unión", tal como se describe en esta memoria, incluye uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más "dominios de unión a antígenos".

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se pueden utilizar de manera indistinta en esta memoria. Un anticuerpo (o un fragmento, variante o derivado del mismo tal como se describe en esta memoria) incluye al menos el dominio variable de una cadena pesada (para especies de camélidos) o al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera. Estructuras de inmunoglobulina básicas en sistemas de vertebrados se entienden relativamente bien. *See, e.g., Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. 1988).* A menos que se establezca de otro modo, el término "anticuerpo" abarca cualquiera que oscile entre un pequeño fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo a un anticuerpo de tamaño

completo, *p.ej.*, un anticuerpo IgG que incluye dos cadenas pesadas completas y dos cadenas ligeras completas, un anticuerpo IgA que incluye cuatro cadenas pesadas completas y cuatro cadenas ligeras completas y, opcionalmente, incluye una cadena J y/o un componente secretor, o un anticuerpo IgM que incluye diez o doce cadenas pesadas completas y diez o doce cadenas ligeras completas y, opcionalmente, incluye una cadena J.

Tal como se comentará con mayor detalle más adelante, el término "inmunoglobulina" comprende diversas amplias clases de polipéptidos que se pueden distinguir bioquímicamente. Los expertos en la técnica apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre ellas (*p.ej.*, $\gamma 1$ - $\gamma 4$ o $\alpha 1$ - $\alpha 2$)). La naturaleza de esta cadena es la que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos) *p.ej.*, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, IgA₂, etc. Están bien caracterizados y se sabe que confieren una especialización funcional. Versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente discernibles por el experto ordinario a la vista de la presente descripción y, por consiguiente, están dentro del alcance de esta descripción.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda (κ , λ). Cada una de las clases de cadena pesada se puede asociar con una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas están unidas de forma covalente entre sí, y las porciones de "cola" de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes, cuando las

inmunoglobulinas son generadas por hibridomas, células B o células huéspedes genéticamente modificadas. En la cadena pesada, la secuencia de aminoácidos discurre desde el extremo N en los extremos de horquilla de la configuración T al extremo C en el fondo de cada una de las cadenas. La estructura básica de determinados anticuerpos, *p.ej.*, anticuerpos IgG, incluye dos subunidades de cadena pesada y dos subunidades de cadena ligera conectadas de forma covalente a través de enlaces disulfuro para formar una estructura "Y", a la que también se alude en esta memoria como una estructura "H2L2".

Las cadenas tanto ligeras como pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se utilizan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de las porciones tanto de cadena ligera variable (VL) como de cadena pesada variable (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad del antígeno. A la inversa, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas tales como secreción, movilidad transplacental, unión al receptor Fc, unión al complemento, y similares. Por convención, la numeración de los dominios de la región constante aumenta a medida que se vuelven más distales del sitio de unión al antígeno o al extremo amino del anticuerpo. La porción N terminal es una región variable y en la porción C terminal es una región constante; los dominios CH3 (o CH4 en el caso de IgM) y CL comprenden realmente el extremo carboxi de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

Tal como se indica arriba, un dominio de unión, *p.ej.*, una región variable del anticuerpo permite a la molécula de

unión reconocer selectivamente y unirse específicamente a un receptor, o un epítipo en un antígeno. Es decir, el dominio VL y el dominio VH, o sub-conjunto de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs), de una molécula de unión, *p. ej.*, un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión tridimensional al antígeno. Más específicamente, el sitio de unión al antígeno se define por tres CDRs en cada una de las cadenas de VH y VL. Determinados anticuerpos forman estructuras mayores. Por ejemplo, IgA puede formar una molécula que incluya dos unidades H2L2, una cadena J y un componente secretor, todos conectados de forma covalente a través de enlaces disulfuro, e IgM puede formar una molécula pentamérica o hexamérica que incluya cinco o seis unidades H2L2 y, opcionalmente, una cadena J conectada de forma covalente a través de enlaces disulfuro.

Las seis "regiones determinantes de complementariedad" o "CDRs" presentes en un dominio de unión anticuerpo antígeno son secuencias no contiguas, cortas, de aminoácidos que está específicamente posicionadas para formar el dominio de unión a medida que el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un entorno acuoso. El resto de los aminoácidos en el dominio de unión, a los que se alude como regiones de "entramado" o "FW", muestran una menor variabilidad inter-molecular. Las regiones de marco adoptan ampliamente una conformación de lámina β y las CDRs forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de la estructura de lámina β . Por tanto, las regiones de entramado actúan para formar un armazón que prevé la situación de las CDRs en la orientación correcta mediante interacciones intercatenarias, no covalentes. El dominio de unión formado

por las CDRs posicionadas define una superficie complementaria al epítipo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria fomenta la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo relacionado. Los aminoácidos que constituyen las CDRs y las regiones de entramado, respectivamente, pueden ser fácilmente identificadas para cualquier región variable de cadena pesada o ligera dada por parte de un experto ordinario en la técnica, ya que se han definido de diversas maneras (véase "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); y Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987), que se incorporan en esta memoria como referencia en su totalidad).

En el caso en que existan dos o más definiciones de un término que se utilice y/o acepte dentro de la técnica, la definición del término, tal como se utiliza en esta memoria, pretende incluir todos estos significados, a menos que se establezca explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del término "región determinante de complementariedad" ("CDR") para describir los sitios no contiguos que se combinan con el antígeno y que se encuentran en la región variable de los polipéptidos de las cadenas ligera y pesada. Estas regiones particulares han sido descritas, por ejemplo, por Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) y por Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), que se incorporan en esta memoria como referencia. Las definiciones de Kabat y Chothia incluyen el solapamiento o subconjuntos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. No obstante, la aplicación de cualquier definición (u otras definiciones conocidas por el experto

ordinario en la técnica) para referirse a una CDR de un anticuerpo o variante del mismo, pretende estar dentro del alcance del término tal como se define y utiliza en esta memoria, a menos que se indique de otro modo. Los aminoácidos apropiados que abarcan las CDRs, según se definen por cada una de las referencias arriba citadas, se recogen más adelante en la Tabla 1 como comparación. Los números exactos de aminoácidos que abarcan una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y el tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar de forma rutinaria qué aminoácidos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

Tabla 1 Definiciones de CDR ¹

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

¹Numeración de todas las definiciones de CDR en la Tabla 1 está de acuerdo con las convenciones de numeración recogidas por Kabat *et al.* (Véase más adelante).

Kabat *et al.* definieron también un sistema de numeración para las cadenas pesada y ligera de anticuerpos, *p. ej.*, secuencias de dominio variable de anticuerpos que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto ordinario en la técnica puede asignar inequívocamente este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia del dominio variable, sin depender de ningún dato experimental además de

la secuencia en sí. Tal como se utiliza en esta memoria, la "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración recogido por Kabat *et al.* U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A menos que se señale explícitamente el uso del sistema de numeración de Kabat, sin embargo la numeración consecutiva se utiliza para todas las secuencias de aminoácidos en esta descripción.

Moléculas de unión, *p. ej.*, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos incluyen, pero no se limitan a anticuerpos policlonales, monoclonales, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos de unión a antígenos, *p. ej.*, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs, Fvs de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fvs enlazados a disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden un dominio VL o VH, fragmentos producidos por un banco de expresión de Fab. Moléculas de scFv son conocidas en la técnica y se describen, *p. ej.*, en la patente de EE.UU. 5.892.019. Moléculas de inmunoglobulina o anticuerpos abarcadas por esta descripción pueden ser de cualquier tipo (*p. ej.*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (*p. ej.*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Por "se une específicamente" se quiere dar a entender generalmente que una molécula de unión, *p. ej.*, un anticuerpo o fragmento, variante o derivado del mismo se une a un epítipo a través de su dominio de unión al antígeno, y que la unión implica una cierta complementariedad entre el dominio de unión al antígeno y el epítipo. De acuerdo con esta definición, se dice que una molécula de unión se "une específicamente" a un epítipo cuando se une a ese epítipo a

través de su dominio de unión al antígeno más fácilmente que si se uniera a un epítipo aleatorio, no relacionado. El término "especificidad" se utiliza en esta memoria para cualificar la afinidad relativa mediante la cual una determinada molécula de unión se une a un determinado epítipo. Por ejemplo, la molécula de unión "A" se considera que tiene una mayor especificidad para un epítipo dado que la molécula de unión "B", o se puede decir que la molécula de unión "A" se une al epítipo "C" con una mayor especificidad que la que tiene para el epítipo "D" relacionado.

Se puede decir que una molécula de unión, *p.ej.*, anticuerpo o fragmento, variante o derivado del mismo descrito en esta memoria se une a un antígeno diana con una constante de disociación ($k(\text{disociación})$) menor que o igual a *p.ej.*, $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 10^{-2} s^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 10^{-3} s^{-1} , $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 10^{-4} s^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o 10^{-5} s^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 10^{-6} s^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ o 10^{-7} s^{-1} .

Se puede decir que una molécula de unión, *p.ej.*, un anticuerpo o fragmento, variante o derivado del mismo descrito en esta memoria se une a un antígeno diana con una constante de asociación ($k(\text{asociación})$) mayor que o igual a *p.ej.*, $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Se dice que una molécula de unión, *p.ej.*, un anticuerpo o fragmento, variante o derivado del mismo inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de referencia o fragmento de unión a antígeno a un epítipo dado si se une preferentemente a ese epítipo de tal manera que bloquea, en cierto grado, la unión del anticuerpo de referencia o

fragmento de unión a antígeno al epítipo. Puede determinarse la inhibición competitiva mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos ELISA de competencia. Se puede decir que una molécula de unión inhibe competitivamente la unión del anticuerpo de referencia o fragmento de unión a antígeno a un epítipo dado en al menos 90%, al menos 80%, al menos 70%, al menos 60% o al menos 50%.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "afinidad" se refiere a una medida de la resistencia de la unión de un epítipo individual con uno o más dominios de unión, *p.ej.*, de una molécula de inmunoglobulina. Véase, *p.ej.*, Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. 1988) en las páginas 27-28. Tal como se utiliza en esta memoria, el término "avidez" se refiere a la estabilidad global del complejo entre una población de dominios de unión y un antígeno. Véase, *p.ej.*, Harlow en las páginas 29-34. La avidez está relacionada tanto con la afinidad de dominios de unión individuales en la población con epítopos específicos como con las valencias de las inmunoglobulinas y el antígeno. Por ejemplo, la interacción entre un anticuerpo monoclonal bivalente y un antígeno con una estructura de epítipo muy repetitiva tal como un polímero, sería una de elevada avidez. Una interacción entre un anticuerpo monoclonal bivalente con un receptor presente a una elevada densidad en una superficie de la célula sería también de elevada avidez.

Moléculas de unión o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos tal como se describen en esta memoria también se pueden describir o especificar en términos de su reactividad cruzada. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "reactividad cruzada" se refiere

a la capacidad de una molécula de unión, *p.ej.*, un anticuerpo o fragmento, variante o derivado del mismo, específico para un antígeno, de reaccionar con un segundo antígeno; una medida de relación entre dos sustancias antigénicas diferentes. Por lo tanto, una molécula de unión reacciona de forma cruzada si se une a un epítipo distinto del que indujo su formación. El epítipo de reacción cruzada contiene generalmente muchas de las características estructurales complementarias del epítipo inductor y, en algunos casos, puede realmente ajustarse mejor que el original.

Una molécula de unión, *p.ej.*, un anticuerpo o fragmento, variante o derivado del mismo también puede describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a un antígeno. Por ejemplo, una molécula de unión puede unirse a un antígeno con una constante de disociación o K_D no mayor que, *p.ej.*, 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M o 10^{-15} M.

Fragmentos de anticuerpos que incluyen anticuerpos de cadena sencilla u otros dominios de unión pueden existir solos o en combinación con uno o más de los siguientes: región de bisagra, dominios CH1, CH2, CH3 o CH4, cadena J o componente secretor. También se incluyen fragmentos de unión a antígenos que pueden incluir cualquier combinación de región o regiones variables con uno o más de región de bisagra, dominios CH1, CH2, CH3 o CH4, cadena J o componente secretor. Moléculas de unión, *p.ej.*, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden ser de cualquier origen animal, incluyendo aves y mamíferos. Los

anticuerpos pueden ser anticuerpos humanos, murinos, de burro, conejo, cabra, cobaya, camello, llama, caballo o pollo. En otra realización, la región variable puede ser constrictoide en origen (*p.ej.*, de tiburones). Tal como se
5 utiliza en esta memoria, anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana, e incluyen anticuerpos aislados de bancos de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y, en algunos casos,
10 pueden expresar inmunoglobulinas endógenas y en otros no, tal como se describe *infra* y, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5.939.598 por Kucherlapati *et al.*

Tal como se describe en esta memoria, la expresión "subunidad de cadena pesada" incluye secuencias de
15 aminoácidos derivadas de una cadena pesada de inmunoglobulina, una molécula de unión, *p.ej.*, un anticuerpo que comprende una subunidad de cadena pesada que incluye al menos uno de: un dominio VH, un dominio CH1, un dominio de bisagra (*p.ej.*, región de bisagra superior, central y/o
20 inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, un dominio CH4 o una variante o fragmento del mismo. Por ejemplo, una molécula de unión, *p.ej.*, un anticuerpo o fragmento, variante o derivado del mismo puede incluir, además de un dominio VH, un dominio CH1; dominio CH1, una bisagra y un dominio CH2;
25 un dominio CH1 y un dominio CH3; un dominio CH1, una bisagra y un dominio CH3; o un dominio CH1, un dominio de bisagra y un dominio CH3. En determinados aspectos, una molécula de unión, *p.ej.*, un anticuerpo o fragmento, variante o derivado del mismo puede incluir, además de un dominio VH, un dominio
30 CH3 y un dominio CH4; o un dominio CH3, un dominio CH4 y una cadena J. Además, una molécula de unión para uso en la

descripción puede carecer de determinadas porciones de región constante, *p.ej.*, todo o parte de un dominio CH2. Se entenderá por parte de un experto ordinario en la técnica que estos dominios (*p.ej.*, la subunidad de cadena pesada) se
5 pueden modificar de modo que varíen en la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina original.

Las subunidades de cadena pesada de una molécula de unión, *p.ej.*, un anticuerpo o fragmento del mismo, pueden incluir dominios derivados de diferentes moléculas de
10 inmunoglobulina. Por ejemplo, una subunidad de cadena pesada de un polipéptido puede incluir un dominio CH1 derivado de una molécula de IgG1 y una región de bisagra derivada de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una subunidad de cadena pesada puede incluir una región de bisagra derivada, en
15 parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una subunidad de cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG4.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión
20 "subunidad de cadena ligera" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de inmunoglobulina. La subunidad de cadena ligera incluye al menos uno de un dominio VL o CL (*p.ej.*, C_K o C_λ).

Moléculas de unión, *p.ej.*, anticuerpos o fragmentos de
25 unión a antígeno, variantes o derivados del mismo se pueden describir o especificar en términos del o de los epítopos o porciones de un antígeno que reconocen o se unen específicamente. La porción de un antígeno diana que interactúa específicamente con el dominio de unión al
30 antígeno de un anticuerpo es un "epítipo" o un "determinante antigénico". Un antígeno diana puede comprender un solo

epítopo o al menos dos epítopos, y puede incluir cualquier número de epítopos, dependiendo del tamaño, conformación y tipo de antígeno.

5 Tal como se ha indicado previamente, las estructuras de las subunidades y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulina son bien conocidas. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "dominio VH" incluye el dominio variable amino-terminal de una cadena pesada de
10 inmunoglobulina y la expresión "dominio CH1" incluye el primer dominio de región constante (la mayoría de las veces amino-terminal) de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio CH1 es adyacente al dominio VH y está en posición amino-terminal con la región de bisagra de una molécula de
15 cadena pesada de inmunoglobulina típica.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "dominio CH2" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que se extiende, *p.ej.*, de aproximadamente el aminoácido 244 al aminoácido 360 de un anticuerpo IgG
20 utilizando esquemas de numeración convencionales (aminoácidos 244 a 360, sistema de numeración de Kabat; y aminoácidos 231-340, sistema de numeración de la UE; véase Kabat EA *et al. op. cit.* El dominio CH3 se extiende desde el dominio CH2 al extremo C de la molécula de IgG, y comprende
25 aproximadamente 108 aminoácidos. Determinadas clases de inmunoglobulina, *p.ej.*, IgM, incluyen además una región CH4.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "región de bisagra" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 al dominio CH2. Esta
30 región de bisagra comprende aproximadamente 25 aminoácidos y es flexible, permitiendo de esta manera que las regiones

de unión a antígeno del extremo N se muevan independientemente.

Como se usa en esta memoria, la expresión "enlace disulfuro" incluye el enlace covalente formado entre dos átomos de azufre. El aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace o puente disulfuro con un segundo grupo tiol. En determinadas moléculas de IgG, las regiones CH1 y CL están enlazadas por un enlace disulfuro, y las dos cadenas pesadas están enlazadas por dos enlaces disulfuro en las posiciones correspondientes a 239 y 242, utilizando el sistema de numeración de Kabat (posición 226 o 229, sistema de numeración de la UE). En determinados aspectos proporcionados en esta memoria, un dominio Fc de IgG4 humana puede mutarse en la región de bisagra para asegurar la formación del enlace disulfuro entre las dos regiones de bisagra, específicamente, una mutación de serina a prolina en la posición 228 (de acuerdo con la numeración de EU). Los dominios Fc de IgG4 que comprenden la mutación S228P se denominan en esta memoria "dominios Fc de IgG4P".

Tal como se utiliza en esta memoria, una "región Fc-TM" es una región Fc de IgG humana que comprende sustituciones de aminoácidos de L234F, L235E y P331S tal como se enumera por el índice de la UE tal como se recoge en Kabat y exhibe una función efectora reducida o derogada (ADCC y/o CDC), una unión reducida o derogada a receptores de Fc y/o toxicidades reducidas o derogadas. Véase, *p.ej.*, Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2011/0059078, que se incorpora en esta memoria como referencia en su totalidad.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que la región o el sitio inmunorreactivo se obtiene o deriva de

una primera especie, y la región constante (que puede ser intacta, parcial o modificada) se obtiene de una segunda especie. En algunas realizaciones, la región o el sitio de unión a diana será de una fuente no humana (*p.ej.*, ratón o primate) y la región constante es humana.

Las expresiones "anticuerpo multiespecífico" o "anticuerpo biespecífico" se refieren a un anticuerpo que tiene dominios de unión para dos o más epítopos diferentes dentro de una sola molécula de anticuerpo. Se pueden construir otras moléculas de unión, además de la estructura de anticuerpo canónica, con dos especificidades de unión. La unión al epítipo por parte de anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos puede ser simultánea o secuencial. Triomas e hibridomas híbridos son dos ejemplos de líneas celulares que pueden secretar anticuerpos biespecíficos. También se pueden construir anticuerpos biespecíficos por medios recombinantes. (Ströhlein y Heiss, *Future Oncol.* 6:1387-94 (2010); Mabry y Snavely, *IDrugs.* 13:543-9 (2010)). Un anticuerpo biespecífico también puede ser un diacuerpo.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "anticuerpo modificado" se refiere a un anticuerpo en el que el dominio variable en la cadena pesada y ligera o en ambas está alterado por al menos un reemplazo parcial de uno o más aminoácidos en las regiones CDR o de entramado. En determinados aspectos, CDRs completas de un anticuerpo de especificidad conocida se pueden injertar en las regiones de entramado de un anticuerpo heterólogo. Aunque CDRs alternativas se pueden derivar de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase que el anticuerpo del que se derivan las regiones de entramado, las CDRs también se pueden derivar de un anticuerpo de clase diferente, *p.ej.*, de un anticuerpo

de una especie diferente. A un anticuerpo modificado en el que una o más CDRs "donantes" de un anticuerpo no humano de especificidad conocida se injertan en una región de entramado de cadena pesada o ligera humana se le alude en esta memoria
5 como un "anticuerpo humanizado". En determinados aspectos, no todas las CDRs son reemplazadas por las CDRs completas de la región variable y todavía la capacidad de unión al antígeno del donante se puede transferir a los dominios variables del receptor. Dadas las explicaciones recogidas
10 en, *p.ej.*, las patentes de EE.UU. N°s 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 6.180.370, estará dentro de la competencia de los expertos en la técnica, ya sea llevando a cabo una experimentación rutinaria o mediante el ensayo de prueba y error obtener un anticuerpo modificado o humanizado
15 funcional.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "modificado" incluye la manipulación de moléculas de ácido nucleico o polipéptido por medios sintéticos (*p.ej.*, por técnicas recombinantes, síntesis de péptidos *in vitro*,
20 mediante acoplamiento enzimático o químico de péptidos o alguna combinación de estas técnicas).

Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "enlazado", "condensado" o "fusión" u otros equivalentes gramaticales pueden utilizarse de manera indistinta. Estos
25 términos se refieren a la unión de dos o más elementos o componentes, por cualquier medio, incluido un medio recombinante o de conjugación química. Una "fusión en marco" se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abierta (ORFs) de polinucleótidos para formar un ORF más largo
30 continuo de una manera que mantenga el marco de lectura de la traducción de los ORFs originales. Por lo tanto, una

proteína de fusión recombinante es una proteína sencilla que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORFs originales (segmentos que no están normalmente unidos de esta forma en la naturaleza). Aunque
5 el marco de lectura se prepara de esta manera de forma continua a través de los segmentos fusionados, los segmentos pueden separarse física o espacialmente mediante, por ejemplo, una secuencia enlazadora en marco. Por ejemplo, polinucleótidos que codifican las CDRs de una región variable
10 de inmunoglobulina se pueden condensar, en marco, pero serán separados por un polinucleótido que codifica al menos una región de entramado de inmunoglobulina o regiones CDR adicionales, siempre que las CDRs "condensadas" sean co-traducidas como parte de un polipéptido continuo.

15 En el contexto de los polipéptidos, una "secuencia lineal" o una "secuencia" es un orden de aminoácidos en un polipéptido en una dirección terminal amino a carboxilo en la que los aminoácidos que son vecinos entre sí en la secuencia son contiguos en la estructura primaria del
20 polipéptido. Una porción de un polipéptido que es "amino-terminal" o "N-terminal" con otra porción de un polipéptido es la porción que llega antes a la cadena polipeptídica secuencial. De manera similar, una porción de un polipéptido que es "carboxi-terminal" o "C-terminal" con otra porción de
25 un polipéptido es la porción que llega más tarde a la cadena polipeptídica secuencial. Por ejemplo, en un anticuerpo típico, el dominio variable es en "N-terminal" a la región constante, y la región constante es "C-terminal" al dominio variable.

30 El término "expresión", como se utiliza en esta memoria, se refiere a un proceso mediante el cual un gen produce un

agente bioquímico, por ejemplo, un polipéptido. El proceso incluye cualquier manifestación de la presencia funcional del gen en la célula que incluye, sin carácter limitante, el silenciamiento génico así como también tanto la expresión transitoria como la expresión estable. Esto incluye, sin carácter limitante, la transcripción del gen en el ARN mensajero (ARNm) y la traducción de este ARNm en uno o más polipéptidos. Si el producto deseado final es un agente bioquímico, la expresión incluye la creación de dicho agente bioquímico y cualquiera de sus precursores. La expresión de un gen produce un "producto génico". Como se usa en esta memoria, un producto génico, puede ser tanto un ácido nucleico, *p.ej.*, un ARN mensajero producido mediante la transcripción de un gen, como un polipéptido que se traduce a partir de un transcrito. Los productos génicos descritos en esta memoria también incluyen ácidos nucleicos con modificaciones posteriores a la transcripción, *p.ej.*, poliadenilación, o polipéptidos con modificaciones posteriores a la traducción, *p.ej.*, metilación, glicosilación, la adición de lípidos, la asociación con otras subunidades proteicas, la escisión proteolítica y similares.

Términos tales como "tratando" o "tratamiento" o "tratar" o "aliviando" o "aliviar" se refieren a medidas terapéuticas que curan, ralentizan, reducen los síntomas de y/o detienen o ralentizan el progreso de una afección o trastorno patológico diagnosticado existente. Términos tales como "prevenir", "prevención", "evitar", "disuasión" y similares se refieren a medidas profilácticas o preventivas que previenen el desarrollo de una afección o trastorno patológico fijado como objetivo, no diagnosticado. Por lo tanto, "aquellos en necesidad de tratamiento" pueden incluir

los que ya tienen el trastorno; los propensos a tener el trastorno y aquellos en los que se ha de prevenir el trastorno.

OX40, o "receptor OX40" es una proteína (también denominada diversamente CD134, miembro 4 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral y ACT-35), expresado en la superficie de células T activadas, *p.ej.*, células T CD4⁺ y CD8⁺, así como en células T reguladoras (Tregs) Foxp3⁺CD4⁺. Las células T CD4⁺ y CD8⁺ que no han experimentado tratamiento anteriormente no expresan OX40 (Croft, M., (2010) *Ann Rev Immunol* 28:57-78).

"Ligando de OX40" ("OX40L") (también denominado diversamente miembro 4 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, gp34, glicoproteína-1 activada transcripcionalmente TAX y CD252) se encuentra ampliamente en células presentadoras de antígenos (APCs) y puede ser inducido en células B activadas, células dendríticas (DCs), células de Langerhans, DCs plasmacitoides y macrófagos (*Id.*). Otras células, incluyendo células T activadas, células NK, mastocitos, células endoteliales y células de la musculatura lisa pueden expresar OX40L en respuesta a citoquinas inflamatorias (*Id.*). OX40L se une específicamente al receptor OX40. La proteína humana se describe en la Publicación PCT N.º WO 95/21915. El OX40L de ratón se describe en la Patente de Estados Unidos. N.º 5.457.035. OX40L se expresa sobre la superficie de las células e incluye un dominio de unión a receptor intracelular, un dominio de unión a receptor transmembrana y un dominio de unión a receptor extracelular. Se puede producir una forma soluble funcionalmente activa de OX40L eliminando los dominios intracelular y transmembrana como se describe, por ejemplo,

en las Patentes de Estados Unidos N.^{os} 5.457.035 y 6.312.700, y el documento W0 95/21915, las divulgaciones de las cuales se incorporan en el presente documento para todos los fines. Una forma funcionalmente activa de OX40L es una forma que
5 retiene la capacidad de unirse específicamente a OX40, es decir, que posee un "dominio de unión al receptor" OX40. Se discuten a continuación los métodos de determinar la capacidad de una molécula o derivado de OX40L de unirse específicamente a OX40. Se describen los métodos de preparar
10 y usar OX40L y sus derivados (tales como los derivados que incluyen un dominio de unión a OX40) en el documento W0 95/21915, que describe también proteínas que comprenden la forma soluble de OX40L unida a otros péptidos, tales como las regiones Fc de la inmunoglobulina humana ("Ig"), que se
15 puede producir para facilitar la purificación del ligando de OX40 a partir de células cultivadas, o para aumentar la estabilidad de la molécula tras la administración in vivo a un mamífero (véase también, Patente de Estados Unidos N.^o 5.457.035 y Publicación PCT N.^o WP 2006/121810, ambos cuales
20 se incorporan por referencia en el presente documento en su totalidad.

El término "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero" se refiere a cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, al cual se desea aplicar
25 una diagnosis, pronóstico o terapia. Sujetos mamíferos incluyen seres humanos, animales domésticos, animales de granja y animales de zoológico, de deportes o mascotas tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, cerdos, vacas, osos, etcétera.

30 Tal como se utiliza en esta memoria, frases tales como "un sujeto que se beneficiaría de la terapia" y "un animal

en necesidad de tratamiento" incluyen sujetos, tales como sujetos mamíferos, que se beneficiarían de la administración de un anticuerpo anti-OX40 humanizado. Anticuerpos de este tipo se pueden utilizar, *p.ej.*, para procesos de diagnóstico y/o para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, *p.ej.*, cáncer.

ANTICUERPOS ANTI-OX40 HUMANIZADOS Y FRAGMENTOS DE UNIÓN A ANTÍGENO DE LOS MISMOS

La presente descripción se refiere a anticuerpos, *p.ej.*, anticuerpos humanizados que se unen específicamente a OX40. En determinados aspectos, un anticuerpo o fragmento del mismo, tal como se proporciona en esta memoria, se puede aislar. En determinados aspectos, un anticuerpo o fragmento del mismo, tal como se proporciona en esta memoria, puede ser sustancialmente puro. En determinados aspectos, un anticuerpo o fragmento del mismo, tal como se proporciona en esta memoria, puede ser que se produzca de forma no natural.

En determinados aspectos, esta descripción proporciona un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende la VH y VL de OX40mAb5, OX40mAb8, OX40mAb10, OX40mAb11, OX40mAb12, OX40mAb13, OX40mAb14, OX40mAb15, OX40mAb16, OX40mAb17, OX40mAb18, OX40mAb19, OX40mAb20, OX40mAb21, OX40mAb22, OX40mAb23, OX40mAb24, OX40mAb25, OX40mAb25a, OX40mAb26, OX40mAb27, OX40mAb28, OX40mAb29, OX40mAb30, OX40mAb31, OX40mAb32 u OX40mAb37. En determinados aspectos, esta descripción proporciona un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende la cadena pesada y la cadena ligera de OX40mAb5, OX40mAb8, OX40mAb10, OX40mAb11, OX40mAb12, OX40mAb13, OX40mAb14, OX40mAb15, OX40mAb16, OX40mAb17, OX40mAb18, OX40mAb19,

OX40mAb20, OX40mAb21, OX40mAb22, OX40mAb23, OX40mAb24, OX40mAb25, OX40mAb25a, OX40mAb26, OX40mAb27, OX40mAb28, OX40mAb29, OX40mAb30, OX40mAb31 u OX40mAb32.

En determinados aspectos, esta descripción proporciona
5 un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende un anticuerpo VH y un anticuerpo VL, en donde VL comprende una secuencia de aminoácidos al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% idéntica con la secuencia de aminoácidos de referencia SEQ
10 ID NO: 29 o SEQ ID NO: 32.

En determinados aspectos, esta descripción proporciona un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende un anticuerpo VH y un anticuerpo VL, en donde VL comprende SEQ ID NO: 29 o SEQ ID
15 NO: 32.

La descripción proporciona, además, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende un anticuerpo VH y un anticuerpo VL, en donde VH comprende las secuencias de aminoácidos VH-CDR1, VH-CDR2
20 y VH-CDR3 idénticas a, o idénticas excepto por ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o una sola sustitución, delección o inserción de aminoácidos en una o más de las VH-CDRS a: la secuencia de aminoácidos VHCDR1 SEQ ID NO: 8, la secuencia de aminoácidos VHCDR2 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO:
25 15, o SEQ ID NO: 16, y la secuencia de aminoácidos VHCDR3 SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27.

La descripción proporciona, además, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende un anticuerpo VH y un anticuerpo VL, en donde
30 VH comprende una secuencia de aminoácidos con la fórmula:

HFw1-HCDR1-HFw2-HCDR2-HFw3-HCDR3-HFw4,

en donde HFW1 es SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7, HCDR1 es SEQ ID NO: 8, HFW2 es SEQ ID NO: 9, HCDR2 es SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16, HFW3 es SEQ ID NO: 17, HCDR3 es SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27, y HFW4 es
5 SEQ ID NO: 28. En determinados aspectos, la secuencia de aminoácidos de HFW2 es SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 13. En determinados aspectos, la secuencia de aminoácidos de HFW3 es SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID
10 NO: 23, o SEQ ID NO: 24.

Además de ello, la descripción proporciona un anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende un anticuerpo VH y un anticuerpo VL, en donde VH comprende una secuencia de
15 aminoácidos al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% idéntica con la secuencia de aminoácidos de referencia SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ
20 ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, o SEQ ID NO: 67.

En un aspecto, esta descripción proporciona un anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende un anticuerpo VH y un anticuerpo VL, en donde VL comprende la secuencia de
25 aminoácidos SEQ ID NO: 29, y VH comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 59.

Un anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta
30 memoria puede incluir, además de una VH y una VL, una región constante de cadena pesada o fragmento de la misma. En

determinados aspectos, la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada humana, *p.ej.*, una región constante de IgG humana, *p.ej.*, una región constante de IgG1 humana o una región constante de IgG4 humana. Tal como se describe en otra parte en esta memoria, en determinados aspectos una región constante de cadena pesada o fragmento de la misma, *p.ej.*, una región constante de IgG humana o fragmento de la misma puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos con relación a una región constante de IgG de tipo salvaje, en que la IgG modificada tiene una o más propiedades deseables con respecto a una región constante de IgG de tipo salvaje. Por ejemplo, la región constante de IgG humana puede ser una región constante de IgG4P o una región constante de IgG1-TM tal como se describe en otra parte en esta memoria.

Un anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria puede incluir, además de una VH y una VL, y opcionalmente una región constante de cadena pesada o fragmento de la misma, una región constante de cadena ligera o fragmento de la misma. En determinados aspectos, la región constante de cadena ligera es una región constante de cadena ligera kappa o lambda, *p.ej.*, una región constante kappa humana o una región constante lambda humana. En un aspecto específico, la región constante de cadena ligera es una región constante κ humana.

En determinados aspectos, la descripción proporciona un anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una cadena pesada de anticuerpo o fragmento de la misma y una cadena ligera de anticuerpo o fragmento de la misma, en que la cadena pesada

comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 71, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 30.

Un anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de
5 unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria puede ser, *p.ej.*, monoclonal, policlonal, recombinante, multiespecífico o cualquier combinación de los mismos. Un anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de
10 unión a antígeno puede ser, *p.ej.*, un fragmento Fv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento dsFv, un fragmento scFv, un fragmento sc(Fv)₂, un fragmento Fd, un fragmento Fv enlazado por disulfuro, un dominio V-NAR, un IgNar, un intracuerpo, un IgG Δ CH₂, un minicuerpo, un fragmento F(ab')₃, un tetracuerpo, un
15 triacuerpo, un diacuerpo, un anticuerpo de dominio sencillo, un DVD-Ig, un fragmento Fcab, un fragmento mAb₂, un fragmento (scFv)₂ o un fragmento scFv-Fc.

En determinados aspectos, un anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal
20 como se proporciona en esta memoria se puede unir específicamente a 0X40 humano, de mono cynomolgus o mono rhesus. En determinados aspectos, un anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria se puede unir a la
25 superficie de células T CD4 humanas primarias, cyno o rhesus o células Jurkat. En determinados aspectos, un anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria se puede unir específicamente a 0X40 tal como expresa sobre células T CD4⁺
30 o CD8⁺ de ser humano, mono cynomolgus, mono rhesus o cualquier combinación de las mismas. En determinados

aspectos, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria se puede unir específicamente a OX40 tal como expresa sobre células T CD4⁺ de ser humano, mono cynomolgus, 5 mono rhesus o cualquier combinación de las mismas. En determinados aspectos, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria no se une a OX40 murino o de rata. En determinados aspectos, un anticuerpo anti-OX40 10 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria no reacciona de forma cruzada con proteínas TNFRSF relacionadas, *p.ej.*, las proteínas TNFRSF enumeradas en la Tabla 3-1 en el Ejemplo 3 que figura más adelante.

15 Un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria puede contener uno o más cambios de aminoácidos conservativos, *p.ej.*, hasta diez cambios conservativos (*p.ej.*, dos aminoácidos sustituidos, tres aminoácidos 20 sustituidos, cuatro aminoácidos sustituidos o cinco aminoácidos sustituidos, etc.), con la condición de que los cambios se hagan en el polipéptido sin cambiar una función bioquímica del anticuerpo anti-OX40 humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo, *p.ej.*, que se une 25 específicamente a OX40, desencadenando con ello la señalización. Por ejemplo, pueden realizarse uno o más cambios conservativos en un dominio de unión al receptor de un anticuerpo tal como se proporciona en esta memoria, sin bloquear su capacidad de unirse a OX40.

30 De forma adicional, se puede eliminar parte de un dominio del polipéptido sin afectar negativamente o eliminar

todas sus funciones. De forma similar, se pueden realizar inserciones o adiciones en la cadena polipeptídica, por ejemplo, añadiendo etiquetas de epítomos, sin afectar negativamente o eliminar sus funciones, como se describe a continuación. Otras modificaciones que se pueden realizar si, deteriorar materialmente una o más funciones de un polipéptido incluyen, por ejemplo, modificaciones químicas y bioquímicas *in vivo* o *in vitro* que incorporan aminoácidos inusuales. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación, glicosilación, marcado, *p. ej.*, con radionucleidos, y diversas modificaciones enzimáticas, como apreciarán fácilmente las personas normalmente expertas en la técnica. Una variedad de métodos para marcar polipéptidos, y marcas útiles para dichos fines, son bien conocidos en la materia, e incluyen isótopos radioactivos tales como ^{32}P , fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enzimas, y antiligandos.

Un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria puede incluir, adicionalmente, un agente heterólogo, *p.ej.*, un agente estabilizante, un modificador de la respuesta inmune o un agente detectable. En determinados aspectos, el agente heterólogo comprende una o más secuencias polipeptídicas adicionales fusionadas con la subunidad polipeptídica mediante un enlace peptídico, tal como una secuencia señal (*p.ej.*, una secuencia señal secretora), una secuencia enlazadora, una etiqueta o marca de aminoácido, o una secuencia peptídica o polipeptídica que facilita la purificación. En determinados aspectos, el polipéptido heterólogo se puede condensar al extremo N o al extremo C de una subunidad de anticuerpo de cadena pesada o cadena ligera,

o fragmento de la misma, siempre que se conserven las características funcionales de los dominios.

En determinados aspectos, el agente heterólogo se puede conjugar químicamente a un anticuerpo anti-OX40 humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria. Agentes heterólogos a modo de ejemplo que se pueden conjugar químicamente a la subunidad polipeptídica incluyen, sin limitación, enlazadores, fármacos, toxinas, agentes formadores de imágenes, compuestos radioactivos, polímeros orgánicos e inorgánicos y cualesquiera otras composiciones que puedan proporcionar una actividad deseada que no es proporcionada por la propia subunidad polipeptídica. Los agentes específicos incluyen, sin limitación, polietilenglicol (PEG), un agente citotóxico, un radionucleido, un agente de diagnóstico por imágenes, biotina.

En determinados aspectos, la descripción proporciona determinados anticuerpos anti-OX40 a utilizar como controles o herramientas de investigación. Por ejemplo, la descripción proporciona un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe arriba, en que VH y VL están condensadas a una cadena pesada de IgG1 murina y una cadena ligera kappa murina, respectivamente. Esta "quimera inversa" es útil para la caracterización *in vivo* en monos rhesus. En otro ejemplo, la región VH en un anticuerpo anti-OX40 humanizado tal como se proporciona en esta memoria puede unirse a diversas regiones constantes de cadena pesada con funciones efectoras alteradas, *p.ej.*, IgG4P humana o IgG1TM humano, descritas en otra parte en esta memoria.

Un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria se puede unir específicamente a OX40 tal como se expresa en células T activadas primarias, *p.ej.*, células T CD4⁺ activadas primarias, células CD8⁺ activadas primarias y/o células T reguladoras de seres humanos, mono cynomolgus, mono rhesus o cualquier combinación de los mismos. En determinados aspectos, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria, *p.ej.*, OX40mAb24, se puede unir a OX40 humano expresado en células T CD4⁺ activadas primarias, con una afinidad de unión de aproximadamente 0.01 pM a aproximadamente 1 nM, *p.ej.*, aproximadamente 1 pM a aproximadamente 500 pM, *p.ej.*, aproximadamente 100 pM a aproximadamente 400 pM, *p.ej.*, aproximadamente 250 pM a aproximadamente 370 pM, todas tal como se miden mediante citometría de flujo. Por ejemplo, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo se puede unir a OX40 humano expresado en células T CD4⁺ activadas primarias, con una afinidad de unión de aproximadamente 0.1 pM, aproximadamente 0.5 pM, aproximadamente 1 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 150 pM, aproximadamente 200 pM, aproximadamente 250 pM, aproximadamente 275 pM, aproximadamente 300 pM, aproximadamente 325 pM, aproximadamente 350 pM, aproximadamente 370 pM, aproximadamente 400 pM, aproximadamente 425 pM, aproximadamente 450 pM, aproximadamente 475 pM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 550 pM, aproximadamente 600 pM, aproximadamente 650 pM, aproximadamente 700 pM,

aproximadamente 750 pM o aproximadamente 1 nM, todas tal como se miden mediante citometría de flujo. En determinados aspectos, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria se puede unir a OX40 expresado sobre células T CD4⁺ de ser humano, con una afinidad de unión de aproximadamente 312 pM. La afinidad de unión puede medirse por numerosos métodos y/o instrumentos diferentes, y las afinidades de unión relativas pueden variar dependiendo del método o instrumento, como entienden bien las personas normalmente expertas en la técnica.

Un anticuerpo anti-OX40 humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria puede ocupar y reticular alguna o todas las moléculas de OX40 en la superficie de una célula, *p.ej.*, una célula T CD4⁺ humana activada primaria. En determinados aspectos, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria, se puede unir a OX40 humano expresado en células T CD4⁺ humanas activadas primarias, y puede lograr un 20% de ocupación del receptor en células T CD4⁺ humanas activadas primarias (CE₂₀) a una concentración de aproximadamente 0.01 pM a aproximadamente 1 nM, *p. ej.*, aproximadamente 0.1 pM a aproximadamente 500 pM, *p.ej.*, aproximadamente 1 pM a aproximadamente 200 pM, *p.ej.*, aproximadamente 10 pM a aproximadamente 100 pM, *p.ej.*, aproximadamente 50 pM a aproximadamente 100 pM, *p.ej.*, aproximadamente 63 pM a aproximadamente 93 pM, *p.ej.*, aproximadamente 1 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 60 pM,

aproximadamente 70 pM, aproximadamente 78 pM,
aproximadamente 80 pM, aproximadamente 90 pM,
aproximadamente 100 pM o aproximadamente 150 pM, tal como se
mide mediante citometría de flujo. En determinados aspectos,
5 un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión
a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria
puede lograr un 20% de ocupación del receptor en células T
CD4⁺ humanas activadas primarias (CE₂₀) a una concentración
de aproximadamente 78 pM, tal como se mide mediante
10 citometría de flujo. En determinados aspectos, un anticuerpo
anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del
mismo tal como se proporciona en esta memoria, se puede unir
a OX40 humano expresado en células T CD4⁺ humanas activadas
primarias, y puede lograr un 50% de ocupación del receptor
15 en células T CD4⁺ humanas activadas primarias (CE₅₀) a una
concentración de aproximadamente 0.01 pM a aproximadamente
1 nM, *p.ej.*, aproximadamente 1 pM a aproximadamente 500 pM,
p.ej., aproximadamente 100 pM a aproximadamente 400 pM,
p.ej., aproximadamente 250 pM a aproximadamente 370 pM,
20 *p.ej.*, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 150 pM,
aproximadamente 200 pM, aproximadamente 250 pM,
aproximadamente 275 pM, aproximadamente 300 pM,
aproximadamente 325 pM, aproximadamente 350 pM,
aproximadamente 370 pM, aproximadamente 400 pM,
25 aproximadamente 425 pM, aproximadamente 450 pM,
aproximadamente 475 pM o aproximadamente 500 pM, todas tal
como se miden mediante citometría de flujo. En determinados
aspectos, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento
de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en
esta memoria puede lograr un 50% de ocupación del receptor
30 en células T CD4⁺ humanas activadas primarias (CE₅₀) a una

concentración de aproximadamente 312 pM, tal como se mide mediante citometría de flujo. En determinados aspectos, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo se puede unir a OX40 humano expresado en células T CD4⁺ humanas activadas primarias, y puede lograr un 90% de ocupación del receptor en células T CD4⁺ humanas activadas primarias (CE₉₀) a una concentración de aproximadamente 100 pM a aproximadamente 100 nM, *p.ej.*, aproximadamente 500 pM a aproximadamente 10 nM, *p.ej.*, aproximadamente 1 nM a aproximadamente 500 nM, *p.ej.*, aproximadamente 2 nM a aproximadamente 4 nM, *p.ej.*, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 4 nM o aproximadamente 5 nM, tal como se mide mediante citometría de flujo. En determinados aspectos, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria puede lograr un 90% de ocupación del receptor en células T CD4⁺ humanas activadas primarias (CE₉₀) a una concentración de aproximadamente 2290 pM a aproximadamente 3330 pM, *p.ej.*, aproximadamente 2810 pM, tal como se mide mediante citometría de flujo.

En determinados aspectos, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria se puede unir a OX40 humano expresado en células Jurkat que sobre-expresan OX40 con una afinidad de unión de aproximadamente 250 pM a aproximadamente 600 pM, *p.ej.*, aproximadamente 424 pM, tal como se mide mediante citometría de flujo.

En determinados aspectos, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria se puede unir a OX40

humano expresado en células Jurkat que sobre-expresan OX40, y puede lograr una CE_{20} a una concentración de aproximadamente 60 a aproximadamente 150 pM, una CE_{50} a una concentración de aproximadamente 250 a aproximadamente 600 pM y una CE_{90} a una concentración de aproximadamente 2260 a aproximadamente 4390 pM, tal como se mide mediante citometría de flujo. En determinados aspectos, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria se puede unir a OX40 humano expresado en células Jurkat que sobre-expresan OX40, y puede lograr una CE_{20} a una concentración de aproximadamente 106 pM, una CE_{50} a una concentración de aproximadamente 424 pM y una CE_{90} a una concentración de aproximadamente 3820 pM, tal como se mide mediante citometría de flujo.

En otro ejemplo, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria se puede unir a OX40 de monocinoma expresado en células T $CD4^+$ de monocinoma activadas primarias con una afinidad de unión de aproximadamente 340 pM a aproximadamente 820 pM, *p.ej.*, aproximadamente 580 pM, tal como se mide mediante citometría de flujo. En otro ejemplo, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria se puede unir a OX40 de monocinoma rhesus expresado en células T $CD4^+$ de monocinoma rhesus activadas primarias con una afinidad de unión de aproximadamente 130 pM a aproximadamente 600 pM, *p.ej.*, aproximadamente 370 pM, tal como se mide mediante citometría de flujo.

En determinados aspectos, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal

como se proporciona en esta memoria puede inducir una proliferación dependiente de la dosis de células T CD4⁺ activadas en un ensayo basado en placa. Por ejemplo, en un ensayo *in vitro* de un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un
5 fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria, *p.ej.*, OX40mAb24, se puede conseguir una respuesta a la proliferación máxima del 20% (CE₂₀) en células T CD4⁺ humanas activadas primarias a una concentración del anticuerpo de aproximadamente 14 pM a
10 aproximadamente 28 pM, *p.ej.*, aproximadamente 21 pM, se puede conseguir una respuesta a la proliferación máxima del 50% (CE₅₀) en células T CD4⁺ humanas activadas primarias a una concentración del anticuerpo de aproximadamente 0.3 pM a
aproximadamente 130 pM, *p.ej.*, aproximadamente 28 pM, y se
15 puede conseguir una respuesta a la proliferación máxima del 90% (CE₉₀) en células T CD4⁺ humanas activadas primarias a una concentración del anticuerpo de aproximadamente 50 pM a aproximadamente 90 pM, *p.ej.*, aproximadamente 72 pM, todas según se mide por citometría de flujo.

20 En determinados aspectos, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria puede inducir una liberación de citoquinas dependiente de la dosis de células T CD4⁺ activadas, *p.ej.*, células T CD4⁺ humanas activadas
25 primarias. En determinados aspectos, la citoquina liberada es IFN γ , TNF α , IL-5, IL-10, IL-2, IL-4, IL-13, IL-8, IL-12 p70, IL-1 β , o cualquier combinación de las mismas. En determinados aspectos, la citoquina es IFN γ , TNF α , IL-5, IL-10, IL-13, o cualquier combinación de las mismas. De manera
30 similar, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en

esta memoria, puede conseguir una proliferación de células T CD4⁺ y una liberación de citoquinas en células T CD4⁺ de mono cynomolgus activadas primarias y en células T CD4⁺ de mono rhesus activadas primarias.

5 En aspectos adicionales, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria, puede activar la vía de NFκB en células T que expresan OX40 en presencia de células que expresan FcγR. Por ejemplo, un anticuerpo anti-OX40
10 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria, puede activar la vía de NFκB en células informadoras de NFκB-luciferasa Jurkat que expresan OX40 que producen luciferasa en respuesta a la estimulación de la vía de señalización de NFκB.
15 Alternativamente, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria, puede activar la vía de NFκB en células que expresan OX40 humano, OX40 de mono cynomolgus u OX40 de mono rhesus.

20 Todavía en otro aspecto, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria, puede facilitar el tratamiento del cáncer, *p.ej.*, ralentizando el crecimiento del tumor, deteniendo el crecimiento del tumor o reduciendo
25 el tamaño de tumores existentes cuando se administra como una dosis eficaz a un sujeto en necesidad de tratamiento de cáncer. En determinados aspectos, la facilitación del tratamiento del cáncer se puede conseguir en presencia de células T. En determinados aspectos, un anticuerpo anti-OX40
30 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria, cuando se administra

como una dosis eficaz a un sujeto en necesidad de tratamiento puede reducir el crecimiento del tumor en al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60% o al menos un 70%, comparado con la
5 administración de un anticuerpo control emparejado en el isotipo.

Todavía en aspectos adicionales, un anticuerpo anti-
OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria, puede inducir la
10 proliferación de células T activadas, que expresan OX40, a través de la unión a OX40, y al mismo tiempo desencadenar una citotoxicidad celular dependiente del complemento o dependiente del anticuerpo contra células T que expresan OX40, *p.ej.*, células T CD4⁺ activadas, células CD8⁺ activadas
15 y/o células T reguladoras. Además, en determinados aspectos, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria, puede inducir la proliferación de células T que expresan OX40, *p.ej.*, células T CD4⁺, CD8⁺ activadas, que
20 expresan OX40 y/o células reguladoras, a través de la unión a OX40, y al mismo tiempo unirse a C1q o desencadenar una citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo, mediada por células NK, de células T que expresan OX40, *p.ej.*, células T CD4⁺ activadas, células CD8⁺ activadas y/o células
25 T reguladoras.

En determinados aspectos, la descripción proporciona un anticuerpo anti-OX40 o un fragmento del mismo que comprende una VH humanizada unida a una región constante de cadena pesada murina y una VL humanizada unida a una región
30 constante de cadena ligera murina, en donde la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 81, y la cadena ligera comprende SEQ ID

NO: 83. En determinados aspectos, la región constante de cadena pesada puede ser, *p.ej.*, una región constante de IgG1 murina. En determinados aspectos, la región constante de cadena ligera puede ser, *p.ej.*, una región constante
5 kappa murina.

En determinados aspectos, la descripción proporciona un anticuerpo 0X40 anti-ratón de rata o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una VH de rata y una VL de rata, en donde VH comprende la secuencia de aminoácidos
10 SEQ ID NO: 85, y VL comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 88. En determinados aspectos, este anticuerpo o fragmento del mismo comprende, además, una región constante de cadena ligera o fragmento de la misma condensada al extremo C de VL. La región constante de cadena ligera puede
15 ser, *p.ej.*, una región constante kappa murina. En determinados aspectos, este anticuerpo o fragmento del mismo comprende, además, una región constante de cadena pesada o fragmento de la misma condensada al extremo C de VH. La región constante de cadena pesada puede ser, *p.ej.*, una
20 región constante de IgG2 murina. En determinados aspectos, este anticuerpo 0X40 anti-ratón de rata comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada SEQ ID NO: 86, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera SEQ ID NO: 89. En determinados aspectos, un anticuerpo 0X40 anti-ratón
25 de rata o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria se puede unir específicamente a 0X40 de ratón. En determinados aspectos, la administración de una dosis eficaz de un anticuerpo 0X40 anti-ratón de rata o un fragmento de unión a antígeno del
30 mismo tal como se proporciona en esta memoria al ratón puede

inhibir el crecimiento de la línea de células Cancerosas de ratón en el ratón.

En determinados aspectos, un fragmento de anticuerpo OX40 anti-ratón de rata tal como se proporciona en esta memoria puede ser, *p.ej.*, un fragmento Fv, un fragmento Fab, 5 un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento dsFv, un fragmento scFv o un fragmento sc(Fv)₂, o cualquier combinación de los mismos.

10 POLINUCELÓTIDOS QUE CODIFICAN ANTICUERPOS ANTI-OX40 HUMANIZADOS, FRAGMENTOS O SUBUNIDADES

Esta descripción proporciona polinucleótidos que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Por ejemplo, la descripción proporciona 15 un polinucleótido, o dos o más polinucleótidos, que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un anticuerpo anti-OX40 humanizado o una subunidad de un anticuerpo anti-OX40 humanizado, o codifica un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de este tipo. Los polinucleótidos de la 20 descripción pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN. ADN incluye ADNc, ADN genómico, *p.ej.*, ADN genómico modificado y ADN sintético; y puede ser de doble cadena o de cadena sencilla y, si es de cadena sencilla, puede ser la cadena codificadora o la cadena no codificadora (anti-sentido). 25

En determinados aspectos, se puede aislar un polinucleótido. En determinados aspectos, un polinucleótido puede ser sustancialmente puro. En determinados aspectos, un polinucleótido puede ser que no se produce de forma natural. 30 En determinados aspectos, un polinucleótido puede ser ADNc o derivado de ADNc. En determinados aspectos, un

polinucleótido se puede producir de forma recombinante. En determinados aspectos, un polinucleótido puede comprender la secuencia codificadora para el polipéptido maduro condensada en el mismo marco de lectura a un polinucleótido que ayuda, por ejemplo, a la expresión y secreción de un polipéptido de una célula huésped (*p.ej.*, una secuencia conductora que funciona como una secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido a partir de la célula). El polipéptido que tiene una secuencia conductora es una preproteína y puede tener la secuencia conductora escindida por la célula huésped para formar la forma madura del polipéptido.

En determinados aspectos, la descripción proporciona un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria, o una subunidad de polipéptido de un anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria.

Se proporcionan también polinucleótidos que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que comprenden uno o un número pequeño de deleciones, adiciones y/o sustituciones. Dichos cambios pueden ser contiguos o se pueden distribuir en diferentes posiciones en el ácido nucleico. Una secuencia de ácido nucleico sustancialmente idéntica puede, por ejemplo, tener 1, o 2, o 3, o 4 o incluso más deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. En determinados aspectos, las una o más deleciones, adiciones y/o sustituciones no alteran el marco de lectura codificado por la secuencia del polinucleótido, de tal manera que se produce un polipéptido

modificado ("mutante") pero sustancialmente idéntico tras la expresión del ácido nucleico.

En determinados aspectos, la descripción proporciona un polinucleótido aislado que comprende un ácido nucleico que
5 codifica un anticuerpo VL, en donde VL comprende una
secuencia de aminoácidos al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%,
95% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de
referencia SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 32. En determinados
aspectos, el polinucleótido codifica una cadena ligera de un
10 anticuerpo, al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%
idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID NO: 31.

En determinados aspectos, esta descripción proporciona
un polinucleótido aislado que comprende un ácido nucleico
que codifica un anticuerpo VL, en donde VL comprende SEQ ID
15 NO: 29 o SEQ ID NO: 32.

La descripción proporciona, además, un polinucleótido
aislado que comprende un ácido nucleico que codifica un
anticuerpo VH, en donde VH comprende las secuencias de
aminoácidos VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 idénticas a, o
20 idénticas excepto por ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres,
dos o una sola sustitución, delección o inserción de
aminoácidos en una o más de las VH-CDRS a: la secuencia de
aminoácidos VHCDR1 SEQ ID NO: 8, la secuencia de aminoácidos
VHCDR2 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 16, y la
25 secuencia de aminoácidos VHCDR3 SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26
o SEQ ID NO: 27.

La descripción proporciona, además, un polinucleótido
aislado, que comprende un ácido nucleico que codifica un
anticuerpo VH, en donde VH comprende una secuencia de
30 aminoácidos con la fórmula:

HFw1-HCDR1-HFw2-HCDR2-HFw3-HCDR3-HFw4,

en donde HFW1 es SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7, HCDR1 es SEQ ID NO: 8, HFW2 es SEQ ID NO: 9, HCDR2 es SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16, HFW3 es SEQ ID NO: 17, HCDR3 es SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, o SEQ ID NO: 27, y HFW4 es
5 SEQ ID NO: 28. En determinados aspectos, la secuencia de aminoácidos de HFW2 es SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 13. En determinados aspectos, la secuencia de aminoácidos de HFW3 es SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID
10 NO: 23, o SEQ ID NO: 24.

Además, la descripción proporciona un polinucleótido aislado que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo VH, en donde VH comprende una secuencia de aminoácidos al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%
15 idéntica a la secuencia de aminoácidos de referencia SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID
20 NO: 65, o SEQ ID NO: 67. En determinados aspectos, el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de referencia SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42,
25 SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, o SEQ ID NO: 68.

En determinados aspectos, la descripción proporciona un
30 polinucleótido que comprende el ácido nucleico de SEQ ID NO:

60, el ácido nucleico de SEQ ID NO: 31, el ácido nucleico de SEQ ID NO: 72, o cualquier combinación de los mismos.

Se proporciona, además, un vector que comprende un polinucleótido tal como se describe arriba. Vectores
5 adecuados se describen en otra parte en esta memoria y son conocidos por el experto ordinario en la técnica.

En determinados aspectos, la descripción proporciona una composición, *p.ej.*, una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido o vector tal como se describe
10 arriba, que comprende además, opcionalmente, uno o más soportes, diluyentes, excipientes u otros aditivos.

En determinados aspectos, la descripción proporciona una composición de polinucleótidos que comprende: un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica
15 una VH y un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica una VL. De acuerdo con este aspecto, la VL y VH juntas pueden comprender una secuencia de aminoácidos de VL al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de referencia SEQ ID NO: 29 o
20 SEQ ID NO: 32, y una VH que comprende: (a) secuencias de aminoácidos de VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 idénticas a, o idénticas excepto por ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o una sola sustitución, delección o inserción de aminoácidos en una o más de las VH-CDRS a: la secuencia de
25 aminoácidos VHCDR1 SEQ ID NO: 8, la secuencia de aminoácidos VHCDR2 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 16, y la secuencia de aminoácidos VHCDR3 SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, o SEQ ID NO: 27; (b) una secuencia de aminoácidos con la fórmula:

30 HFW1-HCDR1-HFW2-HCDR2-HFW3-HCDR3-HFW4,

en donde HFW1 es SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7, HCDR1 es SEQ ID NO: 8, HFW2 es SEQ ID NO: 9, HCDR2 es SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16, HFW3 es SEQ ID NO: 17, HCDR3 es SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, o SEQ ID NO: 27, y HFW4 es
5 SEQ ID NO: 28; o (c) una secuencia de aminoácidos al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de referencia SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51,
10 SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, o SEQ ID NO: 67. Para VH (b), la secuencia de aminoácidos de HFW2 puede ser SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 13; y/o la secuencia de aminoácidos de HFW3 puede ser
15 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 24.

En una composición de polinucleótidos tal como se describe arriba, el polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica una VH y el polinucleótido que
20 comprende un ácido nucleico que codifica una VL pueden residir en un solo vector, o pueden estar en vectores separados, no idénticos. Por consiguiente, la descripción proporciona uno o más vectores que comprenden la composición de polinucleótidos arriba descrita.

25 En algunos casos, una composición de polinucleótidos que codifica una VH y una VL tal como se describe arriba pueden codificar un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se pueden unir específicamente a OX40, *p.ej.*, OX40 humano, OX40 de mono cynomolgus y/u OX40
30 de mono rhesus.

En determinados aspectos, la descripción proporciona un polinucleótido aislado que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-0X40 o fragmento del mismo, que comprende una VH humanizada unida a una región constante de
5 cadena pesada murina y una VL humanizada unida a una región constante de cadena ligera murina, en donde la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 81, y la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 83. En determinados aspectos, la región constante de
10 cadena pesada puede ser, *p.ej.*, una región constante de IgG1 murina. En determinados aspectos, la región constante de cadena ligera puede ser, *p.ej.*, una región constante kappa murina.

En determinados aspectos, la descripción proporciona un polinucleótido aislado que comprende un ácido nucleico que
15 codifica un anticuerpo 0X40 anti-ratón de rata o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una VH de rata y una VL de rata, en donde VH comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 85, y VL comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 88. En determinados aspectos, este
20 anticuerpo o fragmento del mismo comprende, además, una región constante de cadena ligera o fragmento de la misma condensada al extremo C de VL. La región constante de cadena ligera puede ser, *p.ej.*, una región constante kappa murina. En determinados aspectos, este anticuerpo o fragmento del
25 mismo comprende una región constante de cadena pesada o fragmento de la misma condensada al extremo C de VH. La región constante de cadena pesada puede ser, *p.ej.*, una región constante de IgG2a murina. En determinados aspectos, este anticuerpo 0X40 anti-ratón de rata comprende la
30 secuencia de aminoácidos de la cadena pesada SEQ ID NO: 86, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera SEQ ID NO:

89. En determinados aspectos, un anticuerpo OX40 anti-ratón de rata o un fragmento del mismo tal como se proporciona en esta memoria se puede unir específicamente a OX40 de ratón. En determinados aspectos, la administración de una dosis eficaz de un anticuerpo OX40 anti-ratón de rata o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria al ratón puede inhibir el crecimiento de la línea de células cancerosas de ratón en el ratón.

10 Esta descripción proporciona, además, una célula huésped que comprende un polinucleótido, una composición de polinucleótidos o vector tal como se proporciona arriba, en que la célula huésped puede, en algunos casos, expresar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a OX40, *p.ej.*, OX40 humano, OX40 de monomolgus u OX40 de mono rhesus. Una célula huésped de este tipo se puede utilizar en un método de producir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria, método que incluye (a) cultivar la célula huésped y (b) aislar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo expresado de la célula huésped.

 También se proporcionan variantes de polinucleótidos. Las variantes de polinucleótidos pueden contener alteraciones en las regiones codificadoras, regiones no codificadoras, o ambas. En algunos aspectos, variantes de polinucleótidos contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o deleciones silenciosas, pero no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En algunos aspectos, variantes de polinucleótidos se producen mediante sustituciones

silenciosas debido a la degeneración del código genético. Variantes de polinucleótidos se pueden producir para una diversidad de razones, *p.ej.*, para optimizar la expresión del codón para un huésped particular (cambiar codones en el
5 ARNm humano por los de un huésped bacteriano tal como *E. coli*). También se proporcionan vectores y células que comprenden los polinucleótidos descritos en esta memoria.

En algunos aspectos, una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo OX40 anti-ratón de rata o un fragmento del
10 mismo se puede construir mediante síntesis química utilizando un sintetizador de oligonucleótidos. Tales oligonucleótidos pueden diseñarse basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y seleccionando aquellos codones que están favorecidos en la célula huésped
15 en la que se producirá el polipéptido recombinante de interés. Pueden aplicarse métodos convencionales para sintetizar una secuencia de polinucleótido aislada que codifica para un polipéptido de interés aislado. Por ejemplo, puede usarse una secuencia de aminoácidos completa para
20 construir un gen retrotraducido. Además, puede sintetizarse un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido aislado particular. Por ejemplo, pueden sintetizarse varios oligonucleótidos pequeños que codifican para partes del polipéptido deseado
25 y luego ligarse. Los oligonucleótidos individuales pueden contener colgantes 5' o 3' para el ensamblaje complementario.

Una vez ensambladas (mediante síntesis, mutagénesis dirigida al sitio u otro método), las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido aislado
30 particular de interés se pueden insertar en un vector de expresión y enlazar operativamente a una secuencia de control

de la expresión apropiada para la expresión de la proteína en un huésped deseado. El ensamblaje apropiado se puede confirmar, *p.ej.*, mediante secuenciación de nucleótidos, mapeo de restricción y/o expresión de un polipéptido biológicamente activo en un huésped adecuado. Con el fin de obtener altos niveles de expresión de un gen transfectado en un huésped, el gen se puede enlazar operativamente a o asociar con secuencias de control de la expresión transcripcionales y de traducción que son funcionales en el huésped de expresión elegido.

En determinados aspectos, se utilizan vectores de expresión recombinantes para amplificar y expresar el ADN que codifica un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Vectores de expresión recombinantes son construcciones de ADN replicables que tienen fragmentos de ADN sintéticos o derivados de ADNc que codifican una cadena polipeptídica de un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, operativamente enlazado a cualesquiera elementos reguladores de la transcripción o traducción adecuados, derivados de genes de mamíferos, microbianos, virales o de insectos. En un ejemplo, una unidad de transcripción puede comprender un conjunto de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión de genes, por ejemplo promotores o potenciadores de la transcripción, (2) una secuencia estructural o codificadora que se transcribe en ARNm y se traduce en proteína y (3) secuencias de inicio y terminación de la transcripción y traducción apropiadas tal como se describen en detalle más adelante. Tales elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la

transcripción. Adicionalmente se pueden incorporar la capacidad de replicar en un huésped, conferida, *p.ej.*, por un origen de replicación y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de transformantes. Las regiones de ADN

5 están operativamente unidas cuando están relacionadas funcionalmente entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido señal (secuencia señal secretora) está operativamente unido al ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor

10 está operativamente unido a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está situado de modo que se permita la traducción. Los elementos estructurales destinados para su

15 uso en sistemas de expresión en levaduras incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de proteína traducida por una célula hospedadora. Alternativamente, en los casos en los que una proteína recombinante se expresa sin una secuencia conductora o de

20 transporte, la proteína puede incluir una metionina N-terminal. Esta metionina se puede escindir, opcionalmente, con posterioridad de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

La elección de la secuencia de control de la expresión

25 y el vector de expresión dependerá de la elección del huésped. Puede emplearse una amplia variedad de combinaciones de huésped/vector de expresión. Los vectores de expresión útiles para huéspedes eucariotas, incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de la

30 expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Vectores de expresión útiles para huéspedes

bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos tales como plásmidos de *E. coli*, incluyendo pCR 1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos de una gama más amplia de huéspedes tales como M13 y fagos de ADN de cadena sencilla
5 filamentosos.

Células huéspedes adecuadas para la expresión de un anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo incluyen procariotas, levaduras, células de insectos o eucarióticas superiores bajo el control de
10 promotores apropiados. Las procariotas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero tal como se describe a continuación. También podrían emplearse sistemas
15 de traducción libres de células. Información adicional en relación con métodos de producción de proteínas, incluyendo producción de anticuerpos, se pueden encontrar, *p.ej.*, en la publicación de patente de EE.UU. N° 2008/0187954, las patentes de EE.UU. N°s 6.413.746 y 6.660.501, y la
20 publicación de patente internacional N° WO 04009823, cada una de las cuales se incorpora con ello como referencia en esta memoria en su totalidad.

También se pueden emplear diversos sistemas de cultivo de células de mamíferos o de insectos para expresar un
25 anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Puede realizarse la expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero porque tales proteínas se pliegan generalmente de manera correcta, se modifican apropiadamente y son completamente funcionales.
30 Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen HEK-293 y HEK-293T, las líneas COS-7 de

células de riñón de mono, descritas por Gluzman (Cell 23:175, 1981), y otras líneas celulares incluyendo, por ejemplo, células L, C127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO), NS0, HeLa y líneas celulares BHK. Vectores de expresión de mamíferos pueden comprender elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor adecuado y un potenciador enlazado al gen a expresar, y otras secuencias no transcritas flanqueantes 5' ó 3' y secuencias no traducidas 5' ó 3' tales como sitios de unión al ribosoma, un sitio de poliadenilación, sitios de donante y aceptor de corte y empalme y secuencias de terminación de la transcripción. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto se revisan por Luckow & Summers, BioTechnology 6:47 (1988).

Un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo producido por un huésped transformado se puede purificar de acuerdo con cualquier método adecuado. Dichos métodos normalizados incluyen cromatografía (*p. ej.*, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y y cromatografía en columna de dimensionamiento), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Pueden unirse etiquetas de afinidad tales como hexahistidina, dominio de unión a maltosa, secuencia de revestimiento de gripe y glutatión-S-transferasa, a la proteína para permitir una fácil purificación mediante el paso por una columna de afinidad adecuada. También pueden caracterizarse físicamente proteínas aisladas usando tales técnicas como proteólisis, resonancia magnética nuclear o cristalografía de rayos X.

Por ejemplo, pueden concentrarse en primer lugar sobrenadantes de sistemas que secretan proteína recombinante en medios de cultivo usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad
5 de ultrafiltración Amicon® o Millipore Pellicon. Tras la etapa de concentración, puede aplicarse el concentrado a una matriz de purificación adecuada. Alternativamente, puede emplearse una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o un sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo
10 (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser de acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos empleados comúnmente en la purificación de proteínas. Alternativamente, puede emplearse una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados
15 incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Finalmente, se pueden emplear una o más etapas de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase reversa (RP-HPLC), empleando medios de RP-HPLC hidrofóbicos, *p.ej.*, gel de sílice que tiene grupos metilo
20 u otros grupos alifáticos colgantes, para purificar adicionalmente un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo. También pueden emplearse algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, para proporcionar una
25 proteína recombinante homogénea.

Un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo producido en cultivo bacteriano se puede aislar, por ejemplo, mediante extracción inicial de sedimentos de células, seguido de una o más etapas de
30 concentración, separación salina, de intercambio de iones acuoso o de cromatografía por exclusión de tamaño. Puede

emplearse cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para las etapas de purificación finales. Pueden perturbarse las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante mediante cualquier
5 método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, perturbación mecánica o el uso de agentes de lisado celular.

Métodos conocidos en la técnica para purificar anticuerpos y otras proteínas también incluyen, por ejemplo,
10 los descritos en las publicaciones de patente de EE.UU. N°s 2008/0312425, 2008/0177048 y 2009/0187005, cada una de las cuales se incorpora con ello como referencia en su totalidad en esta memoria.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

15 Métodos de preparar y administrar un anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria a un sujeto en necesidad del mismo, *p.ej.*, para potenciar una respuesta inmune en un paciente con cáncer, *p.ej.*, para inhibir o
20 reducir el crecimiento del tumor, son bien conocidos o se pueden determinar fácilmente por los expertos en la técnica. La vía de administración de un anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser, por ejemplo, oral, parenteral, por inhalación o tópica.
25 El término parenteral tal como se usa en el presente documento incluye, por ejemplo, administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Aunque se contempla claramente que todas estas formas de administración son formas adecuadas, otro
30 ejemplo de una forma para la administración sería una solución para inyección, en particular para el goteo o la

inyección intraarterial o intravenosa. Habitualmente, una composición farmacéutica adecuada puede comprender, sin limitación, un tampón (*p.ej.*, tampón acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (*p.ej.*, polisorbato), un agente estabilizador (*p.ej.*, albúmina humana), etc. En otros métodos compatibles con las enseñanzas de esta memoria, un anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno tal como se proporciona en esta memoria se puede suministrar directamente al sitio de la población celular adversa, aumentando con ello la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

Determinadas composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento pueden administrarse por vía oral en una forma farmacéutica aceptable incluyendo, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. Determinadas composiciones farmacéuticas pueden administrarse también mediante aerosol nasal o inhalación. Dichas composiciones pueden prepararse como soluciones en suero salino, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

La cantidad de un anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se puede combinar con materiales de soporte para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto tratado y del modo de administración particular. La composición pueden administrarse como una única dosis, múltiples dosis o a lo largo de un periodo de tiempo establecido en una infusión. Los regímenes de dosificación también pueden ajustarse para

proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica).

Por "dosis o cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se entiende una cantidad de un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que, cuando se administra, proporciona una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un paciente con una enfermedad o afección a tratar.

KITS

Esta descripción proporciona, además, kits que comprenden un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en esta memoria y que se pueden utilizar para realizar los métodos descritos en esta memoria. En determinadas realizaciones, un kit comprende al menos un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo en uno o más recipientes. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que el anticuerpo anti-OX40 humanizado descrito se puede incorporar fácilmente en uno de los formatos de kit establecidos que son bien conocidos en la técnica.

INMUNOENSAYOS

Un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo se puede someter a ensayo en cuanto a la unión específica y/o selectiva por cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que utilizan técnicas tales como transferencia Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima), ensayo de foco fluorescente (FFA) , inmunoensayos de "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones

de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, por nombrar unos pocos. Tales ensayos son de rutina y se conocen bien en la técnica (véase, *p.ej.*, Ausubel
5 *et al.*, eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1, que se incorpora como referencia en la presente en su totalidad).

Métodos y reactivos adecuados para la determinación de las características de unión de un anticuerpo anti-0X40 humanizado tal como se proporciona en esta memoria son conocidos en la técnica y/o son comercialmente disponibles. El equipo y el software diseñado para dichos análisis cinéticos están comercialmente disponibles (*p.ej.*, software
15 BIAcore®, BIAevaluation®, GE Healthcare; software KINEXA®, Sapidyne Instruments).

MÉTODOS DE POTENCIAMIENTO Y TRATAMIENTO INMUNE

El potenciamiento de una respuesta inmune específica para el antígeno en un sujeto (*p.ej.*, un sujeto mamífero, tal como un sujeto humano) al acoplar 0X40 en células T
20 activadas, *p.ej.*, células T CD4⁺ activadas y/o células T CD8⁺ activadas, durante o después de la activación del antígeno se puede lograr utilizando una amplia diversidad de métodos. El método de elección dependerá principalmente del tipo de antígeno frente al cual se desea potenciar la respuesta
25 inmunitaria, y se discuten a continuación diversos métodos disponibles. Cualquiera que sea el método seleccionado, un anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo se puede administrar a un sujeto, *p.ej.*,
30 un paciente humano de manera que es presentado a células T

del sujeto durante o poco después del cebado de las células T por parte del antígeno.

En determinados aspectos, la descripción proporciona un método para fomentar la supervivencia o proliferación de células T activadas, *p.ej.*, células T CD4⁺ activadas y/o células T CD8⁺ activadas, que comprende poner en contacto las células T activadas, *p.ej.*, células T CD4⁺ activadas y/o células T CD8⁺ activadas, con un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, bajo condiciones en las que el anticuerpo anti-OX40 humanizado puede unirse específicamente a OX40 en la superficie de las células T, *p.ej.*, células T CD4⁺ activadas y/o células T CD8⁺ activadas. En determinados aspectos, la puesta en contacto es *in vitro*. En determinados aspectos, la puesta en contacto es *in vivo*, *p. ej.*, a través de la administración de una dosis eficaz del anticuerpo anti-OX40 humanizado a un sujeto en necesidad de tratamiento. En determinados aspectos, la puesta en contacto puede producirse al mismo tiempo que la activación de células T, *p. ej.*, la activación del antígeno, en determinados aspectos, la puesta en contacto puede producirse tras la activación de células T.

En aspectos adicionales, la descripción proporciona un método de inducir la liberación de citoquinas a partir de células T activadas, *p.ej.*, células T CD4⁺ activadas y/o células T CD8⁺ activadas, que comprende poner en contacto las células T activadas, *p.ej.*, células T CD4⁺ activadas y/o células T CD8⁺ activadas con un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se proporciona en esta memoria, en donde el anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del

mismo puede unirse específicamente a OX40 en la superficie de las células T activadas, *p.ej.*, células T CD4⁺ activadas y/o células T CD8⁺ activadas. En determinados aspectos, la puesta en contacto es *in vitro*. En determinados aspectos, la puesta en contacto es *in vivo*, *p.ej.*, a través de la administración de una dosis eficaz del anticuerpo anti-OX40 humanizado a un sujeto en necesidad de tratamiento. En determinados aspectos, la puesta en contacto puede producirse al mismo tiempo que la activación de las células T, *p.ej.*, la activación del antígeno, en determinados aspectos, la puesta en contacto puede producirse tras la activación de las células T. En determinados aspectos, la citoquina puede ser IFN γ , TNF α , IL-5, IL-10, IL-2, IL-4, IL-13, IL-8, IL-12 p70, IL-1 β , o cualquier combinación de las mismas. En determinados aspectos, la citoquina es IFN γ , TNF α , IL-5, IL-10, IL-13, o cualquier combinación de las mismas.

En determinados aspectos, las células T activadas, *p.ej.*, células T CD4⁺ activadas y/o células T CD8⁺ activadas son células T humanas, células T de mono cynomolgus, células T de mono rhesus, o cualquier combinación de las mismas.

La descripción proporciona, además, un método de fomentar la activación de células T, que comprende poner en contacto las células T con un anticuerpo anti-OX40 humanizado tal como se proporciona en esta memoria, en donde el anticuerpo anti-OX40 humanizado puede unirse específicamente a OX40 en la superficie de las células T. En determinados aspectos, la puesta en contacto se produce en presencia del antígeno, *p. ej.*, un antígeno tumoral. En determinados aspectos, el método comprende, además, la interacción de un dominio Fc del anticuerpo anti-OX40 humanizado con una célula que expresa Fc γ R, *p. ej.*, una célula B, monocito, macrófago,

célula dendrítica mieloide o plasmacitoide, célula dendrítica folicular, célula de Langerhans, célula endotelial, célula NK, célula T activada, neutrófilo, eosinófilo, plaqueta, mastocito, una célula CD45⁺ de un tumor humano primario o ganglio linfático de drenaje o no drenaje de tumores, una célula CD45⁺ de otras estructuras linfoides secundarias o terciarias, o una combinación de los mismos. En determinados aspectos, la activación de los linfocitos T puede medirse mediante la estimulación de la ruta de transducción de la señal NF κ B. En determinados aspectos, la puesta en contacto es *in vitro*. En determinados aspectos, la puesta en contacto es *in vivo*, *p.ej.*, a través de la administración de una dosis eficaz del anticuerpo anti-0X40 humanizado a un sujeto en necesidad de tratamiento.

La descripción proporciona, además, un método de tratar el cáncer en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-0X40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una composición o formulación que comprende el anticuerpo anti-0X40 humanizado. En determinados aspectos, el cáncer es un tumor sólido. De acuerdo con este método, la administración del anticuerpo anti-0X40 humanizado o de la composición puede inhibir el crecimiento del tumor; puede fomentar la reducción del tumor, o ambos. En determinados aspectos, la inhibición del crecimiento del tumor se consigue en presencia de células T.

Los términos "cáncer", "tumor", "canceroso" y "maligno" se refieren a o describen el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cánceres incluyen pero no se limitan a, carcinoma incluyendo adenocarcinomas, linfomas,

blastomas, melanomas, sarcomas y leucemias. Ejemplos más particulares de cánceres de este tipo incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, cáncer pancreático, glioblastoma, glioma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado tal como carcinoma hepático y hepatoma, cáncer de vejiga, cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama mediado hormonalmente, véase, *p. ej.*, Innes
5 *et al.* (2006) Br. J. Cáncer 94:1057-1065), cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, mieloma (tal como mieloma múltiple), carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón tal como carcinoma de células renales y tumores de Wilms, carcinoma de células basales, melanoma,
15 cáncer de próstata, cáncer vulval, cáncer del tiroides, cáncer testicular, cáncer esofágico, diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, incluyendo, pero no limitados a cánceres de células escamosas y cánceres de origen mucinoso tales como cáncer de ovario mucinoso, colangiocarcinoma
20 (hígado) y carcinoma papilar renal.

La descripción proporciona, además, un método de prevenir o tratar un cáncer en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento
25 de unión a antígeno del mismo, una composición o formulación que comprende el anticuerpo anti-OX40 humanizado, o un polinucleótido, un vector o una célula huésped, tal como se describe en esta memoria.

Las dosis eficaces de composiciones para el tratamiento del cáncer varían dependiendo de muchos factores diferentes,
30 incluyendo los medios de administración, el sitio diana, el

estado fisiológico del paciente, tanto si el paciente es un ser humano como un animal, otras medicaciones administradas, y tanto si el tratamiento es profiláctico como terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano, pero también
5 pueden tratarse mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos. Pueden ajustarse las dosificaciones de tratamiento usando métodos de rutina conocidos por los expertos en la técnica para optimizar la seguridad y eficacia.

10 Las composiciones de la descripción pueden administrarse mediante cualquier método adecuado, *p. ej.*, por vía parenteral, intraventricular, oral, mediante inhalación de un pulverizador, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. El término
15 "parenteral" como se usa en el presente documento incluye la inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasínovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal o las técnicas de infusión.

20 La descripción proporciona, además, un método de tratar una respuesta inmune en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o
25 una composición o formulación que comprende el anticuerpo anti-OX40 humanizado.

El sujeto que se va a tratar puede ser cualquier animal, *p. ej.*, mamífero, en necesidad de tratamiento, en determinados aspectos, el sujeto es un sujeto humano.

30 En su forma más simple, una preparación a administrar a un sujeto es un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un

fragmento de unión a antígeno del mismo, administrado en forma de dosificación convencional, que se puede combinar con un excipiente, soporte o diluyente farmacéutico tal como se describe en otra parte en esta memoria.

5 Un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo se puede administrar por cualquier método adecuado tal como se describe en otra parte en esta memoria, *p. ej.*, vía infusión IV. En determinados aspectos, un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión
10 a antígeno del mismo se puede introducir en un tumor, o en la vecindad de una célula tumoral.

Todos los tipos de tumores son especialmente adecuados al tratamiento mediante esta solución incluyendo, sin limitación, carcinoma de mama, pulmón, páncreas, ovario,
15 riñón, colon y vejiga, así como melanomas, sarcomas y linfomas.

La implicación del receptor OX40 en células T activadas, *p.ej.*, células T CD4⁺ activadas y/o células T CD8⁺ activadas durante o poco después del cebado por parte de un antígeno
20 resulta en una respuesta incrementada de las células T activadas, *p.ej.*, células T CD4⁺ activadas y/o células T CD8⁺ activadas al antígeno. En el contexto de la presente divulgación, el término "implicación" se refiere a la unión y a la estimulación de al menos una actividad mediada por el
25 receptor OX40. Por ejemplo, la implicación del receptor OX40 en células T activadas específicas para el antígeno, *p.ej.*, células T CD4⁺ activadas y/o células T CD8⁺ activadas resulta en una proliferación incrementada de células T en comparación con la respuesta al antígeno solo, y en una producción
30 incrementada de citoquinas. Se puede mantener la respuesta elevada al antígeno durante un periodo de tiempo

sustancialmente más largo que en ausencia de implicación del receptor OX40. Por lo tanto, la estimulación a través del receptor OX40 potencia la respuesta inmune específica para el antígeno al reforzar el reconocimiento de células T de antígenos, *p.ej.*, antígenos de tumores.

Agonistas de OX40 pueden potenciar las respuestas inmunes específicas para los antígenos en un sujeto, tal como un sujeto humano, cuando se administran al sujeto durante o poco después del cebado de células T por parte de un antígeno. Los agonistas de OX40 incluyen el ligando de OX40 ("OX40L"), tal como proteínas de fusión de OX40L solubles y anticuerpos dirigidos contra OX40 o fragmentos de los mismos. Un ejemplo específico es un anticuerpo humanizado que se une específicamente a OX40, desencadenando con ello la señalización. Mediante esta descripción se proporciona una colección de anticuerpos monoclonales anti-OX40 humanizados. También se describen ácidos nucleicos que incluyen secuencias de polinucleótidos que codifican este tipo de anticuerpos. Esta descripción también proporciona métodos para potenciar una respuesta inmune específica para el antígeno en un sujeto utilizando anticuerpos monoclonales anti-OX40 humanizados.

EPÍTOPOS DE OX40

La porción de una molécula diana, *p.ej.*, un polipéptido OX40 que interactúa específicamente con el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo es un "epítipo," o un "determinante antigénico". Una molécula diana, *p.ej.*, un polipéptido puede ser un solo epítipo," pero típicamente incluye al menos dos epítopos, y puede incluir cualquier número de epítopos, dependiendo del tamaño, conformación y tipo de molécula diana.

Se piensa que el tamaño mínimo de un epítopo que puede ser unido por un anticuerpo en un polipéptido diana es de aproximadamente cuatro a cinco aminoácidos. Epítopos de péptidos o polipéptidos pueden contener al menos siete, al menos nueve, al menos diez o al menos aproximadamente 15 o más aminoácidos. Dado que un anticuerpo puede reconocer un antígeno de polipéptido en su forma terciaria, los aminoácidos que comprenden un epítopo necesitan ser contiguos. Un epítopo de OX40, *p.ej.*, OX40 humano tal como se proporciona en esta memoria, puede incluir al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de OX40, *p.ej.*, OX40 humano. En determinados aspectos, un epítopo de OX40, *p.ej.*, OX40 humano tal como se proporciona en esta memoria consiste en un péptido de 100 o menos aminoácidos, 75 o menos aminoácidos, 50 o menos aminoácidos, 40 o menos aminoácidos, 35 o menos aminoácidos, 30 o menos aminoácidos, 25 o menos aminoácidos, 20 o menos aminoácidos o 15 o menos aminoácidos, o puede incluir al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de OX40, *p.ej.*, OX40 humano. Por otra parte, un epítopo de OX40, *p.ej.*, OX40 humano tal como se proporciona en esta memoria puede incluir no más de 4, no más de 5, no más de 6, no más de 7, no más de 8, no más de 9, no más de 10, no más de 15, no más de 20, no más de 25 o puede consistir entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de OX40, *p.ej.*, OX40 humano.

En determinados aspectos, un anticuerpo anti-0X40 o un fragmento del mismo tal como se proporciona en esta memoria, se une a un epítipo de 0X40, *p.ej.*, 0X40 humano, 0X40 de mono rhesus u 0X40 de mono cynomolgus que caen dentro del
5 tercer dominio rico en cisteína (CRD3) de 0X40, *p.ej.*, dentro de los aminoácidos 108 a 146 de 0X40 humano (SEQ ID NO: 91) o un péptido al menos 17%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85% y al menos 90%, al menos 95% o al menos 100% idéntico a los aminoácidos 108 a 146 de SEQ ID NO: 91. Por
10 "cae dentro" de la CRD3 de 0X40 se entiende que el epítipo puede incluir 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 15 o más, o 30 o más aminoácidos contiguos o no contiguos de la región de 0X40 que consiste en la región CRD3, *p.ej.*, aminoácidos 108 a 146 de SEQ ID NO: 91, o un
15 péptido al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85% y al menos 90%, al menos 95% o al menos 100% idéntico a los aminoácidos 108 a 146 de SEQ ID NO: 91.

En determinados aspectos, el péptido de CRD3 de 0X40 que une el anticuerpo proporcionado en esta memoria conserva
20 una leucina en la posición correspondiente al aminoácido 116 de SEQ ID NO: 91, y una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 126 de SEQ ID NO: 91. Por ejemplo, determinados anticuerpos 0X40 o fragmentos de los mismos tal como se proporcionan en esta memoria se unen a
25 0X40 humano, pero no se unen a 0X40 de ratón o rata. La región CRD3 de 0X40 de ratón se extiende desde aproximadamente el aminoácido 104 hasta aproximadamente el aminoácido 144 de SEQ ID NO: 92. Aminoácido Q113 de 0X40 de ratón, SEQ ID NO: 92, corresponde al aminoácido L116 de 0X40 humano, SEQ ID NO: 91, y aminoácido V124 de ratón 0X40, SEQ
30 ID, NO: 92, corresponde al aminoácido A126 de 0X40 humano,

SEQ ID NO: 91. Tal como se muestra en el Ejemplo 10, un anticuerpo OX40 tal como se proporciona en esta memoria, *p.ej.*, OX40mAb24, puede unirse a una variante de OX40 de ratón que comprende SEQ ID NO: 92, excepto por una mutación Q113L y una V124A.

En determinados aspectos, se proporciona un péptido aislado, consistiendo el péptido en o comprendiendo un epítipo que se une específicamente a un anticuerpo OX40 tal como se proporciona en esta memoria, *p.ej.*, OX40mAb24. En determinados aspectos, el péptido consiste en 100 o menos aminoácidos, 75 o menos aminoácidos, 50 o menos aminoácidos, 40 o menos aminoácidos, 35 o menos aminoácidos, 30 o menos aminoácidos, 25 o menos aminoácidos, 20 o menos aminoácidos o 15 o menos aminoácidos, e incluye al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de la CRD3 de OX40, *p.ej.*, una región de OX40 al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85% y al menos 90%, al menos 95% o al menos 100% idéntico a los aminoácidos 108 a 146 de SEQ ID NO: 91. En determinados aspectos, el péptido conserva una leucina en la posición correspondiente al aminoácido 116 de SEQ ID NO: 91, y una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 126 de SEQ ID NO: 91.

Un péptido aislado de este tipo se puede utilizar, *p.ej.*, para el rastreo de bancos para moléculas de unión que específicamente se unen a OX40, o como un inmunógeno para generar anticuerpos anti-OX40 en un animal objeto.

Esta descripción emplea, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología celular, cultivo

celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2^a ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis *et al.* Patente de Estados Unidos N.º 4.683.195; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); and in Ausubel *et al.* (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

Los principios generales de modificación por ingeniería de anticuerpos se exponen en Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2^a ed.; Oxford Univ. Press). Press). Los principios generales de modificación por ingeniería de

proteínas se exponen en Rickwood *et al.*, eds. (1995) Protein Engineering, A Practical Approach (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Press, Oxford, Eng.). Los principios generales de anticuerpos y unión de anticuerpo-hapteno se exponen en: Nisonoff (1984) Molecular Immunology (2^a ed.; 5 Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); y Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (Chapman and Hall, New York, N.Y.). Adicionalmente, se siguen generalmente métodos convencionales en inmunología conocidos en la 10 técnica y no descritos específicamente como en Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nueva York; Stites *et al.*, eds. (1994) Basic and Clinical Immunology (8^a ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) y Mishell y Shiigi (eds) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W.H. 15 Freeman y Co., NY). Freeman and Co., NY).

Los trabajos de referencia habituales que exponen los principios generales de inmunología incluyen Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself 20 Discrimination (John Wiley & Sons, NY); Kennett *et al.*, eds. (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, ed. Burden *et al.*, 25 (Elsevier, Amsterdam); Goldsby *et al.*, eds. (2000) Kuby Immunology (4^a ed.; H. Freeman & Co.); Roitt *et al.* (2001) Immunology (6th ed.; London: Mosby); Abbas *et al.* (2005) Cellular and Molecular Immunology (5^a ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann y Dubel (2001) Antibody 30 Engineering (Springer Verlag); Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor

Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall 2003); Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach y Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press).

5 Todas las referencias citadas anteriormente, así como todas las referencias citadas en la presente, se incorporan por referencia a la presente en su totalidad.

Los siguientes ejemplos se presentan a modo de ilustración y no a modo de limitación.

10 EJEMPLOS

Abreviaturas y definiciones de términos y expresiones se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 2. Lista de abreviaturas y definiciones de términos

15	Abreviatura o término	Definición
	1A7	Anticuerpo IgG1 kappa de ratón control del isotipo
20	9B12	Anticuerpo monoclonal de IgG1κ OX40 anti-humano de ratón
	A375	Línea de células de melanoma humano
	Aa	aminoácido
	ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
25	ADPE	Desarrollo de Anticuerpos y Modificación de Proteínas
	ANOVA	Análisis de varianza
	Asp	ácido aspártico
30	BSA	Albúmina de suero bovino

	Abreviatura o término	Definición
5	BLASTP	Herramienta de Investigación de Alineamiento Local Básica para homología de secuencias de proteínas
	C	Volúmenes finales de los tumores del grupo control
	CD	agrupación de diferenciación
10	CDC	Citotoxicidad dependiente de complemento
	CD4 ⁺ , OX40 ⁺	CD4 positivo, OX40 positivo
	CDR	regiones determinantes de complementariedad
	CFA	Adyuvante completo de Freund
15	CFSE	Éster succinimidílico de carboxifluoresceína
	IC	intervalo de confianza
	C1q	Componente de complemento C1q
	CR	Respuesta completa
	CRD	Dominio rico en cisteína
20	Cyno	cynomolgus
	DM-L	medios de densidad - linfocito
	E:T	efector-a-diana (relación)
	CE	concentración eficaz
25	EC _f	concentración eficaz que resulta en f% de efecto máximo
	CE ₂₀	concentración eficaz que resulta en un 20% de efecto máximo
	CE ₅₀	concentración eficaz semi-máxima
30	CE ₉₀	concentración eficaz que resulta en un 90% de efecto máximo
	F	fracción de máximo

	Abreviatura o término	Definición
5	FACS	clasificación de células activada por fluorescencia
	FBS	suero bovino fetal
	Fc	Fragmento, cristalizable
10	Fcer1g-/-	cepa de ratón modificada genéticamente; carece de la expresión de receptores Fc gamma activantes (Fc gamma I, II y IV)
	Fcgr2b-/-	cepa de ratón modificada genéticamente; carece de la expresión del receptor de Fc gamma IIb inhibidor
	FCS	Citometría de flujo estándar
15	Fcγ	Fragmento, cristalizable gamma
	FMO	Fluorescencia menos-uno
	FP	Proteína de fusión
	G	Fuerza de gravedad
	H	hora
20	H ⁺ L	Cadenas pesada más ligera
	HEK293	Línea de células de riñón embrionaria humana
	Hr	hora
	HSC	Célula madre hematopoyética
	Hu	Ser humano
25	ICOS	Co-estimulador de células T inducible
	IgG	Inmunoglobulina
	IgG1	Inmunoglobulina G1
	IL-2	Interleucina 2
	IP	intraperitoneal
30	UI	Unidades internacionales

Abreviatura o término	Definición
5 K _d	Constante de disociación de unión en equilibrio
KI	activación
KLH	Hemocianina de lamprea bocallave
K _O	inactivación
K _p	Constante de disociación en equilibrio
Leu	Leucina
10 M	Ratón
mAb	Anticuerpo monoclonal
mL	mililitro
15 OX40mAb24	Anticuerpo monoclonal IgG1κ OX40 anti-humano humanizado
IFM	intensidad de fluorescencia media
mOX40L FP	Proteína de fusión IgG1 de ratón ligando OX40 de ratón
20 mOX40L FP (Y182A)	Proteína de fusión IgG1 de ratón ligando OX40 de ratón modificada para que tenga unión reducida a OX40
NFκB	Potenciador de cadena ligera kappa de factor nuclear de células B activadas
25 NIP228	Anticuerpo monoclonal IgG1 kappa de ratón contra ácido 4-hidroxi-3-yodo-5-nitrofenilacético
NK	asesina natural
NOD/SCID	Diabético no obeso/inmunodeficiente combinado grave
30 NSG	Ratones con fondo genético Nod.Cg- <i>Prkd</i> ^{cscid112rgtm/wy} /SzJ

Abreviatura o término	Definición
OX40L	Ligando de OX40
5 OX40L FP IgG4P Y180A	Proteína de fusión IgG4P de ligando del OX40 humano genomanipulada para tener una unión reducida a OX40
OX40mAb24	Anticuerpo monoclonal IgG1 κ OX40 anti-humano humanizado
10 OX86	Anticuerpo monoclonal IgG1 κ OX40 anti-ratón de rata
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PHA-L	Fitohemaglutinina-Leucoaglutinina
15 IP	Yoduro de propidio
PK/PD	Farmacocinética/farmacodinámica
RBC	glóbulo rojo
RBCL	Lisis de glóbulos rojos
RBD	Dominio de unión al receptor
20 Rh	humano recombinante
RLU	Unidades de luz relativas
RPMI	Medio de Roswell Park Memorial Institute 1640
ROA	Vía de administración
25 SC	Subcutáneo
SD	Desviación estándar
SEM	Error típico de la media
Ser	serina
30 T	Volúmenes finales de los tumores del grupo de ensayo
Tcm	Célula T de la memoria central

Abreviatura o término	Definición
TCR	Receptor de células T
Teff	Célula T efectora
Tem	Célula T de la memoria efectora
TGI	Inhibición del crecimiento tumoral
TIL	Leucocito infiltrante de tumores
TM	Dominio de transmembrana
TNFR	receptor del factor de necrosis tumoral
TNFRSF	superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral
TRAF2	factor 2 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
Treg	células T reguladoras
μL	microlitro
μg	Microgramo
V	volumen

EJEMPLO 1: Humanización de Mab Murino 9B12 de OX40 Anti-humano

20 mAb murino 9B12 se humanizó injertando sus CDRs en entramados de línea germinal humana seleccionados. Las secuencias de la región variable de la cadena pesada (VH) y la región variable de la cadena ligera (VL) de mAB murino 9B12 se compararon con las secuencias de la línea germinal de anticuerpos humanos disponible en las bases de datos NCBI

25 públicas. Entramados (FR) de aceptores humanos se identificaron en base a la homología de secuencia más alta. Cuando se selecciona un entramado aceptor óptimo, se consideraron varios criterios tales como residuos concordantes que podrían impactar en la unión (residuos en la zona Vernier, residuos de clase canónica y residuos de la

30

interfaz VH/VL) y el potencial de inmunogenicidad (baja frecuencia de la línea germinal). Una secuencia de FR aceptora humana híbrida óptima se designó para VH y VL independientemente seleccionando el segmento de línea germinal de inmunoglobulina humana más homólogo para cada una de las regiones individuales del entramado. Se combinaron tres secuencias aceptoras de la línea germinal diferentes para formar la cadena principal del entramado de VH humanizado, mientras que para VL se seleccionaron dos secuencias aceptoras de la línea germinal diferentes. El molde aceptor de la línea germinal totalmente humana elegido para la cadena de VH (9B12VH-hu) era una combinación de IGVH4-34*09 (FR 1), VH4-39 (FR 2), VH6-1(FR 3) y JH4 (FR 4). VL (9B12VL-hu1)era una combinación de 018 (FR 1), 018 (FR 2), L23 (FR 3) y JK1 (FR 4). La homología del entramado entre la secuencia murina y la secuencia aceptora del molde humana era aproximadamente 72% para VH y 77% para VL.

Residuos del entramado murino que podrían influir o mantener la conformación funcional de la CDR parental y que no coincidía con la secuencia de la línea germinal humana se identificaron y re-introdujeron selectivamente en el FR aceptor humano con el fin de preservar mejor la afinidad y funcionalidad de unión de 9B12. En este caso, los residuos de la FR de ratón 27D, 39K, 47Y, 48M, 71R, 78Y y 91F en la cadena VH y 44V y 68R en la cadena VL se retro-mutaron al molde humano. Residuos de CDR tal como se definen por Kabat se condensaron en los entramados aceptores diseñados tanto para VH como VL para generar el anticuerpo humanizado. Dos genes VH humanizados (9B12VH-hu y 9B12VH-hu39K71R) y dos genes (VL 9B12VL-hu1 y 9B12VL-hu2) fueron sintetizados por GeneART

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), y luego fueron clonados en el vector de expresión de IgG1 pOE en la firma.

Se ha generado y caracterizado un panel de variantes humanizadas en ensayos de unión y proliferación basados en
5 células T. Las variantes humanizadas que contienen varios aminoácidos del entramado revirtieron a residuos de FR de ratón en la región variable de cadena pesada, unida a OX40 en células T CD4⁺ con afinidades comparables y potencias similares (proliferación de células T) a 9B12. La cadena
10 ligera variable se emparejaba con todas las variantes de VH humanizadas que codifican entramados totalmente humanizados. Para reducir el riesgo de inmunogenicidad, el número de residuos de ratón en el FR humano de VH se redujo adicionalmente a 3 ó 4 reemplazando residuos de ratón no
15 influyentes por los correspondientes residuos humanos. Para eliminar potenciales cargas de la secuencia, el sitio de desamidación NG en VH-CDR2, el sitio de unión de integrina RYD y el sitio de isomerización DG en VH-CDR3 se separaron proactivamente de forma independiente o en combinación. Para
20 evitar la ADCC mediada por la función efectora de Fc de IgG1 humana, se realizaron variantes de Fc IgG4P e IgG1TM para los mAbs conductores humanizados. Las variantes IgG4P e IgG1TM exhibían la misma actividad de unión a OX40 que las variantes IgG1, pero una actividad ADCC significativamente
25 reducida que es muy similar al mAb murino 9B12. En resumen, las variantes humanizadas exhibían afinidades de unión celular y potencias *in vitro* comparables al mAb de ratón parental 9B12. Las diferencias de aminoácidos entre la variante VH humanizada, todas las cuales se emparejan con la
30 VL humanizada, se resumen en la FIG. 1.

La quimera reversa se modificó para la caracterización *in vivo* en monos rhesus. En síntesis, la VH y VL de mAb24 humanizado se injertaron en las cadenas pesada constante y ligera constante de 9B12 murino. La caracterización *in vitro* demostró que las porciones de Fab de la quimera reversa se unían a OX40 humano, comparable a mAb24.

EJEMPLO 2: Afinidad de Unión y Ocupación del Receptor de OX40mAb24 a OX40 Nativo Expresada en la Superficie de células T Humanas Activadas, de Primates No humanos, Rata y Ratón

2.1 MATERIALES

En la Tabla 2-1 se relacionan los materiales utilizados en este ejemplo.

Tabla 2-1 Materiales

Elemento	Fuente
IgG anti-humana de cabra AlexaFluor® A488 (H+L)	Life Technologies, Carlsbad, CA
IgG anti-ratón de cabra AlexaFluor® A488 (H+L)	Life Technologies, Carlsbad, CA
IgG anti-rata de cabra AlexaFluor® A488 (H+L)	Life Technologies, Carlsbad, CA
Solución de antibiótico/antimicótico, 100X	Life Technologies, Carlsbad, CA
Anticuerpo CD134 dirigido contra Ig de rata (clon OX40)	Biolegend, San Jose, CA
Anticuerpo CD3 anti-rata	BD Biosciences, San Jose, CA
Anticuerpo CD134 dirigido contra Ig de ratón (clon OX86)	MedImmune, Gaithersburg, MD

	Elemento	Fuente
5	Clon RTK2071 de mAb de control del κ isotipo, IgG1 anti-rata	Biolegend, San Jose, CA
	Ratón Balb/C	Harlan, Indianápolis, IN
	Beta mercaptoetanol (BME)	Life Technologies, Carlsbad, CA
10	Concanavalina A	Sigma, St. Louis, MO
	Ácido etilendiamino tetraacético (EDTA)	Life Technologies, Carlsbad, CA
	Suero de ternero recién nacido (FBS) inactivado por calor	Life Technologies, Carlsbad, CA
15	Anticuerpo CD3 anti-ratón de hamster	BD Biosciences, San Jose, CA
	Anticuerpo CD28 anti-ratón de hamster	BD Biosciences, San Jose, CA
	IL-2, recombinante humana	Preprotech, Rocky Hill, NJ
20	Medio de separación de linfocitos (LSM)	MP Biomedicals, Santa Ana, CA
	Kit de aislamiento de células T CD4 de rata Magclect	R&D Systems, Minneapolis, MN
	Tampón MACS Miltenyi	Miltenyi San, Diego, CA
25	Kit de aislamiento de células T CD4 de ratón	Miltenyi San, Diego, CA
	Clon MOPC-21 de mAb de control del κ isotipo, IgG1 de ratón	Biolegend, San Jose, CA
	Kit de aislamiento de células T CD4 de primates no humanos	Miltenyi San, Diego, CA
30		

	Elemento	Fuente
	Placas de 96 pocillos de fondo redondo no tratadas con TC	VWR, Radnor, PA
5	Percoll	Sigma, St. Louis, MO
	Fitohemaglutinina-Leucoaglutinina (PHA-L)	Roche Applied Science, Indianápolis, IN
	Solución salina tamponada con fosfato, pH 7.2 (PBS)	Life Technologies, Carlsbad, CA
10	Kit de enriquecimiento de células T CD4 RosetteSep	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC
	RPMI-1640	Life Technologies, Carlsbad, CA
15	Rata Sprague Dawley	Harlan, Indianápolis, IN
	Sangre completa, anticoagulada con heparina de sodio	MedImmune Blood Donor Program, Gaithersburg, MD

20 En este ejemplo se realizaron ensayos de unión en equilibrio basados en células para medir la afinidad aparente de la unión de OX40mAb24 a OX40 expresado en la superficie celular de células T humanas, de primates no humanos, de rata y de ratón. Adicionalmente, los ensayos de unión en equilibrio se utilizaron para determinar las concentraciones

25 de OX40mAb24 que consiguen una ocupación del 20%, 50% o 90% del receptor OX40 humano en células T CD4⁺ activadas.

Las concentraciones de OX40mAb24 requeridas para ocupación del 20%, 50% o 90% del receptor también se determinaron para la unión de 9B12, el anticuerpo monoclonal

30 OX40 anti-humano murino del que se derivó OX40mAb24, a OX40 humano y de primates no humanos expresado en la superficie

de células T CD4⁺ para una comparación de la unión de OX40mAb24 y 9B12.

2.2 Ensayos

2.2.1 Unión de OX40mAb24 a células T CD4⁺ Humanas Primarias y células T Jurkat que expresan OX40

La constante de unión en equilibrio aparente (K_d) para la unión de OX40mAb24 a OX40 humano y las concentraciones requeridas para unir el 20%, 50% o 90% del receptor OX40 humano de la superficie celular en equilibrio se calcularon a partir de curvas de unión de OX40mAb24 a células T CD4⁺ humanas primarias activadas que expresan OX40 o células T Jurkat que sobre-expresan OX40 humano. Al mismo tiempo se realizaron experimentos similares para evaluar la unión de 9B12 a estas células para la comparación con los valores de OX40mAb24.

Células T CD4⁺ humanas primarias se aislaron primero de sangre entera anti-coagulada con con heparina sódica obtenida de donantes sanos a través del Programa de Donación de Sangre MedImmune utilizando un kit de enriquecimiento de células T CD4⁺ RosetteSep (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC) y un protocolo modificado del fabricante.

Células T CD4⁺ humanas primarias se cultivaron durante 48h con 2 µg/mL de PHA-L y 20 UI/mL de rhIL-2 para activar células T y supra-regular OX40. Las células T, que eran >95% viables, se utilizaron subsiguientemente en experimentos de unión de OX40mAb24. Todos los donantes representan individuos únicos; es decir, no se realizaron experimentos de unión repetidos con células T CD4⁺ del mismo donante.

Células del clon 64 de NFκB-luciferasa Jurkat que sobre-expresan OX40 humano se cultivaron en RPMI completo + FBS al

10% antes de los experimentos de unión, sin necesidad de activación.

OX40mAb24 (10 µg/mL) o 9B12 (10 µg/mL) se diluyeron a través de series de dilución dobles de 17 puntos. OX40mAb24
5 se añadió a 100.000 células (células T CD4⁺ primarias activadas o células del clon 64 de NFκB-luciferasa Jurkat que sobre-expresan OX40 humano) por pocillo y se incubaron durante una hora a 4°C. Para la sustracción de la unión de fondo, las células se incubaron en presencia de anticuerpo
10 secundario solo. El anticuerpo monoclonal IgG1 humano R347 control y el clon MOPC-21 del isotipo de IgG1 de ratón se utilizaron en los experimentos con células T de Jurkat que sobre-expresan OX40 para demostrar la especificidad para la unión a OX40 de OX40mAb24 o 9B12, respectivamente. Después
15 de la incubación, las células se lavaron tres veces con 200 µL de tampón FACS frío (4°C) y se incubaron con 100 µL de tampón FACS (PBS + suero de ternero recién nacido inactivado por calor al 2%) que contiene 10 µg/mL de anticuerpo secundario IgG anti-humano de cabra marcado con AlexaFluor®
20 647 (para la unión a OX40mAb24) o 10 µg/mL de anticuerpo secundario IgG anti-ratón de cabra marcado con AlexaFluor® 488 (para la unión a 9B12) y 5 µg/mL de yoduro de propidio (PI). Tras la incubación del anticuerpo secundario, las células se lavaron y suspendieron en 100 µL de tampón FACS
25 para el análisis por citometría de flujo en un citómetro de flujo BD LSRII tal como se describe más adelante.

2.2.2 Unión de OX40mAb24 células T CD4⁺ T de Ratón

OX40mAb24 se investigó en cuanto a la unión a OX40 de
30 ratón expresado en células T CD4⁺ primarias activadas. Al mismo tiempo se realizaron experimentos similares para evaluar la unión de 9B12 a estas células para la comparación

con OX40mAb24. Células T CD4⁺ de ratón se aislaron de bazo de ratones BALB/c normales recogidos. De acuerdo con el siguiente protocolo:

Los bazo se filtraron a través de un filtro de nilón de 70 µm para liberar los esplenocitos y el filtró se lavó con 1 mL de medio completo (RPMI-1640 más FBS al 10%, disolución de antibiótico/antimicótico al 1% y 55 µM de beta mercaptoetanol [BME]). Los esplenocitos se sedimentaron y el sobrenadante se desechó. El sedimento se trató con 5 mL de tampón de lisis de glóbulos rojos (RBC) IX y se incubó para lisar RBCs. La osmolaridad se restableció mediante la adición de medio completo al final del tiempo de incubación.

Las células se sedimentaron, se lavaron en tampón Miltenyi MACS (PBS pH 7.2 + albúmina de suero bovino (BSA) al 0.5% + ácido etilendiaminotetraacético [EDTA] 2 mM) y el sobrenadante se desechó. El sedimento se suspendió en tampón MACS frío y se contó con un contador ViCell para determinar el número de células y la viabilidad.

El aislamiento de células T CD4⁺ de ratón se realizó con un kit de proceso Miltenyi (San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y las células aisladas se suspendieron en medio completo

Células T CD4⁺ de ratón (150.000 por pocillo en 100 µL de medio completo) se cultivaron durante una noche en placas de 96 pocillos recubiertas con 2 µg/mL de cada uno de los anticuerpos CD3 anti-ratón de hamster y CD28 anti-ratón de hamster para activar las células T e inducir la expresión de OX40. Células T CD4⁺ activadas se retiraron de la placa de incubación y 100.000 células se transfirieron a cada uno de los pocillos de una placa de fondo redondo de 96 pocillos

tratada con cultivo no tisular para los ensayos de unión y se lavó una vez con tampón FACS. La unión se realizó con 10 µg/mL de OX40mAb24, 9B12 y anticuerpos OX40 anti-ratón de rata, clon OX86 (control positivo) cada uno diluido en serie 3 veces en tampón FACS para una curva de datos de 10 puntos. Para los controles negativos, 10 µg/mL de IgG1 humana R347, IgG1 de ratón MOPC-21 o IgG1 de rata RTK2071 se diluyeron 6 veces en tampón FACS para una curva de datos de 3 puntos. Tampón FACS (50 µL) que contenía OX40mAb24, o anticuerpos, se añadió a células T CD4⁺ por duplicado y se incubó. Tras la incubación primaria, las células se lavaron con 200 µL de tampón FACS a 4°C y se incubaron con 50 µL de tampón FACS que contenía 10 µg/mL de anticuerpo secundario anti-humano de cabra marcado con AlexaFluor® 488, 10 µg/mL de anticuerpo secundario anti-ratón de cabra marcado con AlexaFluor® 488 o anticuerpo secundario anti-rata de cabra marcado con AlexaFluor® 488 y 5 µg/mL de PI. Tras la incubación del anticuerpo secundario, las células se lavaron con tampón FACS a 4°C (200 µL por lavado) y se suspendieron en 100 µL de tampón FACS para el análisis por citometría de flujo en un citómetro de flujo BD LSRII tal como se describe en la Sección 2.3.

2.2.3 Unión de OX40mAb24 Binding a células T CD4⁺ de Rata

OX40mAb24 se investigó en cuanto a la unión a OX40 de rata expresado en células T CD4⁺ primarias activadas. Al mismo tiempo se realizaron experimentos similares con 9B12 para permitir la comparación con OX40mAb24. Células T CD4⁺ de rata se aislaron de bazos de ratas Sprague-Dawley normales, recién recogidos de acuerdo con el protocolo arriba descrito para el aislamiento de esplenocitos de ratón, excepto que el

aislamiento de células T CD4⁺ de rata se realizó con un kit de R&D Systems Magellect (Minneapolis, MN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Células T CD4⁺ de rata (1 x 10⁶ por mL de medio completo) se cultivaron durante la noche en un matraz de cultivo de células T75 con 1 µg/mL de concanavalina A (Con A) y 500 UI/mL de IL-2, para activar las células T e inducir la expresión de OX40, y se incubaron durante la noche. Células T CD4⁺ activadas se retiraron del matraz y 100.000 células se transfirieron a cada uno de los pocillos de una placa de fondo redondo de 96 pocillos tratada con cultivo no tisular para los ensayos de unión y se lavó con tampón FACS. La unión se realizó con 10 µg/mL de OX40mAb24, 9B12 y anticuerpo CD134 anti-rata de ratón, clon OX40 (control positivo) diluido en serie 3 veces en tampón FACS para una curva de datos de 10 puntos. Para los controles negativos, 10 µg/mL de IgG1 humana R347 o IgG1 de ratón MOPC-21 se diluyeron en serie 6 veces para una curva de datos de 3 puntos. 100 µL de proteína control OX40mAb24, 9B12 o el anticuerpo clon OX40 se añadieron a células T CD4⁺ por duplicado y se incubaron. Tras la incubación primaria, las células se lavaron con 200 µL de tampón FCAS a 4°C por lavado y se incubaron con 100 µL de tampón FACS que contenía 10 µg/mL de anticuerpo secundario anti-humano de cabra marcado con AlexaFluor® 488 o anticuerpo secundario anti-ratón de cabra marcado con AlexaFluor® 488 y 5 µg/mL de PI. Tras la incubación del anticuerpo secundario, las células se procesaron para la citometría de flujo tal como se describe en la Sección 2.3.

2.2.4 Unión de OX40mAb24 células T CD4⁺ de Mono Cynomolgus

OX40mAb24 se investigó en cuanto a la unión a OX40 de mono cynomolgus (cyno) expresado en células T CD4⁺ primarias activadas. Al mismo tiempo se realizaron experimentos similares con 9B12 para permitir la comparación con los valores de OX40mAb24. Células T CD4⁺ de cyno se aislaron de sangre entera anti-coagulada con heparina sódica obtenida de donantes cyno sanos (N=2) de World Wide Primates (Miami, FL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Sangre entera se dispuso sobre 30 mL de Percoll al 60% en un tubo de centrifuga cónico de 50 mL. La sangre se centrifugó y células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) se recogieron en la interfaz y se lavaron con tampón MACS de Miltenyi frío (4°C) a 1200 RPM durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y el sedimento se trató con 5 mL de tampón de lisis 1X RBC y se incubó. Medio completo (RPMI con FBS al 10% y 1% de antibióticos/antimicóticos) se añadió al sedimento para detener el proceso de lisis al final del tiempo de incubación.

Las células se sedimentaron y se lavaron con 20 mL de tampón MACS de Miltenyi frío (4°C). El sobrenadante se desechó y el sedimento de células se suspendió en tampón MACS frío (4°C) y se contó con un contador ViCell para determinar el número de células y la viabilidad.

El aislamiento de células T CD4⁺ de cyno se realizó con un kit de primates no humanos de Miltenyi de acuerdo con las instrucciones del fabricante, luego se contaron células T CD4⁺ se contaron con un contador ViCell y se suspendieron a razón de 1×10^6 por mL en medio completo tal como se describe arriba.

Células T CD4⁺ de cyno (1×10^6 por mL en medio completo) se incubaron durante 48 horas en un matraz de cultivo de células T75 con 2 µg/mL de PHA-L y 20 UI/mL de IL-2, para activar las células T e inducir la expresión de OX40. Células T CD4⁺ activadas se retiraron del matraz y 100.000 células se transfirieron a cada uno de los pocillos de una placa de fondo redondo de 96 pocillos tratada con cultivo no tisular para los ensayos de unión y se lavó con 200 µL de tampón FACS. La unión se realizó con 10 µg/mL de OX40mAb24 o 9B12 diluido en serie 4 veces en tampón FACS para una curva de datos de 11 puntos, o tanto IgG1 humana R347 o el clon MOPC-21 de IgG1 de ratón (controles negativos) se diluyeron en serie 6 veces para una curva de datos de 3 puntos. OX40mAb24, 9B12 o proteína control se añadió a células CD4⁺ y se incubó. Tras la incubación primaria, las células se lavaron con 200 µL de tampón FCAS frío (4°C) por lavado y se incubaron con 100 µL de tampón FACS que contenía 10 µg/mL de anticuerpo secundario anti-humano de cabra marcado con AlexaFluor® 488 o 10 µg/mL de anticuerpo secundario anti-ratón de cabra marcado con AlexaFluor® 488 y 5 µg/mL de PI. Tras la incubación del anticuerpo secundario, las células se procesaron para la citometría de flujo tal como se describe en la Sección 2.3.

2.2.5 Unión de OX40mAb24 células T CD4⁺ de Mono Rhesus

OX40mAb24 se investigó en cuanto a la unión a OX40 de macaco rhesus expresado en células T CD4⁺ primarias activadas. Al mismo tiempo se realizaron experimentos similares con 9B12 para permitir la comparación con los valores de OX40mAb24. Células T CD4⁺ de rhesus se aislaron de sangre entera anti-coagulada con heparina sódica obtenida

de donantes rhesus sanos (N=2) de World Wide Primates (Miami, FL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Sangre de rhesus heparinizada (20 mL) se diluyó 1:1 con PBS y se dispuso sobre 15 mL de LSM al 95% en un tubo de centrífuga cónico de 50 mL. La sangre se centrifugó, PBMC se recogieron en la interfaz y se lavaron dos veces con tampón MACS de Miltenyi a 400xg durante 30 minutos. El sobrenadante se desechó y el sedimento se trató con 5 mL de tampón de lisis 1X RBC y se incubó. Medio completo (RPMI con FBS al 10% y 1% de antibióticos/antimicóticos) se añadió al sedimento para detener el proceso de lisis al final del tiempo de incubación. Las células se sedimentaron y se lavaron con 20 mL de tampón MACS frío de Miltenyi. El sobrenadante se desechó y el sedimento se suspendió en tampón MACS frío y se contó con un contador ViCell para determinar el número de células y la viabilidad. El aislamiento de células T CD4⁺ de rhesus se realizó con un kit de primates no humanos de Miltenyi (San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Células T CD4⁺ de rhesus (1×10^6 por mL en medio completo) se cultivaron durante 48 horas en un matraz de cultivo de células T75 con 5 µg/mL de Con-A y 1000 UI/mL de IL-2, para activar las células T e inducir la expresión de OX40. La unión a 100.000 células T CD4⁺ de rhesus activadas se realizó con 10 µg/mL de OX40mAb24 y 9B12 diluidos en serie 3 veces en tampón FACS para una curva de datos de 10 puntos (experimento 1) o de 12 puntos (experimento 2) y 10 µg/mL de controles del isotipo humano y de ratón diluidos 6 veces para 2 puntos de datos (experimento 1) o 4 puntos de datos (experimento 2). La unión de anticuerpo secundario anti-humano de cabra marcado con AlexaFluor® 488 y anticuerpo

secundario anti-ratón de cabra marcado con AlexaFluor® 488 era como se describió arriba para células T CD4⁺ de cyno y la citometría de flujo tal como se describe en la Sección 2.3.

5 2.3 Citometría de Flujo

La citometría de flujo en los ensayos descritos en la Sección 2.1 se realizó utilizando un citómetro de flujo LSRII (Becton-Dickinson, San Jose, CA). Se utilizó el software de análisis de citometría Flow Jo (TreeStar, Ashland, OR) para determinar la unión de OX40mAb24, 9B12 y proteínas control a células. Pocillos que contienen células que expresan OX40 (anticuerpo no teñido, sin PI o secundario), células unidas a reactivo de anticuerpo secundario marcado con AlexaFluor® 488 o AlexaFluor® 647 solo o células permeabilizadas con saponina al 0.1% y tratadas con 10 µg/mL de PI se prepararon para los controles de compensación de una sola mancha. Tras la compensación de la fluorescencia, células vivas (PI negativas) se sincronizaron y se determinó la intensidad de fluorescencia media (MFI) del anticuerpo secundario.

2.4 Cálculos

2.4.1. Determinación de la Constante de Disociación en Equilibrio Aparente (K_d)

Se utilizó el Software GraphPad Prism versión 5.01 para Windows, GraphPad Software, San Diego California EE.UU., www.graphpad.com, para representar la MFI de la unión de OX40mAb24 frente a la concentración de proteínas (M) to crear curvas de unión, a partir de las cuales se determinó la K_d aparente. Para determinar la K_d aparente para la unión de OX40mBa24 y 9B12 a OX40 humano, de ratón, rata, mono cyno o

rhesus se empleó una ecuación de regresión no lineal (ajuste de la curva) para la unión a un sitio (específica).

2.4.2 Determinación de los Valores de 20%, 50% y 90% de Ocupación del Receptor

5 La cantidad de anticuerpo monoclonal (mAb) unido a su receptor se puede estimar a partir de la siguiente relación de unión:

Ecuación 1: Receptor (A) + mAb (B) $\leftrightarrow$ complejo receptor-mAb (AB)

10 La constante de disociación de unión (K_d) del anticuerpo respectivo se representa por:

Ecuación 2:

$$K_d = \frac{[A][B]}{[AB]}$$

15 en que [A] y [B] representan las concentraciones de receptor libre y anticuerpo, respectivamente.

Finalmente, la ocupación fraccional, la fracción (F) de todas las moléculas del receptor que están unidas al anticuerpo, se pueden calcular por:

20 **Ecuación 3:**

$$F = \frac{[AB]}{[A] + [AB]}$$

La formación de la ecuación 2 y la sustitución en la ecuación 3 resulta en:

25 **Ecuación 4:**

$$F = \frac{[A][B]/K_d}{[A] + ([A][B]/K_d)}$$

La simplificación de la ecuación 4 resulta en:

Ecuación 5:

30

$$F = \frac{[B]}{[B] + K_d}$$

Por lo tanto, en condiciones de equilibrio, la fracción de todas las moléculas del receptor que están unidas al anticuerpo se puede calcular si se conocen la concentración de mAb libre y la constante de disociación K_d del anticuerpo respectivo.

La derivación de esta fórmula para el cálculo de la concentración de anticuerpos requerida para una ocupación del receptor fraccional, expresada como F , conduce a la siguiente fórmula:

10

Ecuación 6:

$$[B] = F * K_d / (1 - F)$$

15

en que $[B]$ es igual a la concentración de mAb, en este caso OX40mAb24. Esta fórmula (Ecuación 6) se utilizó para el cálculo de las concentraciones de OX40mAb24 requeridas para una ocupación del receptor de 20, 50 y 90% ($F = 0.20, 0.50, 0.90$) a partir de experimentos de unión celular a partir de los cuales se calculó el valor K_d utilizando la ecuación de regresión no lineal (ajuste de la curva) para la unión a un sitio (específica) arriba descrita.

20

2.5 Métodos Estadísticos

25

30

Se utilizó un test t de Student no pareado de 2 lados con un nivel de confianza de 95% y corrección de Welch para representar conjuntos de datos con diferentes desviaciones típicas en el software Graphpad Prism para determinar estadísticamente diferencias significativas entre los valores K_d aparentes o los valores de ocupación del receptor aparentes determinados para la unión de OX40mAb24 a OX40 en células T CD4 humanas primarias activadas frente a células T Jurkat que expresan OX40. Las estadísticas descriptivas (*es decir*, media y error típico de la media) se presentan en el sumario de figuras y tablas.

2.6 RESULTADOS

2.6.1 Unión de OX40mAb24 a células T CD4⁺ humanas primarias

OX40mAb24 unido a células T CD4⁺ humanas activadas con una K_d aparente media de 312 pM y valores para un 20%, 50% y 90% de ocupación del receptor de 78.1, 312 y 2810 pM, respectivamente; n = 6 ensayos de unión con seis donantes de células T independientes (Figuras 2A y 2B, y Tabla 2-2).

En comparación, 9B12 unido a células T CD4⁺ humanas activadas con una K_d media de 669 pM y valores para un 20%, 50% y 90% de ocupación del receptor 167, 669 y 6020 pM, respectivamente (Figuras 2C y 2D, y Tabla 2-2). La relación entre los valores de K_d aparente para 9B12 y OX40mAb24 era, por lo tanto, de 2.1 a 1, y refleja una afinidad de unión similar a OX40 humano para los anticuerpos monoclonales murino y humanizado.

Tabla 2-2 Afinidad Aparente (K_d) y Valores de Ocupación del Receptor para la Unión de OX40mAb24 o 9B12 a células T CD4⁺ Humanas Primarias que expresan OX40

Unión Proteína	N donantes	K _d (ErrTíp), pM	CE ₂₀ (ErrTíp), pM	CE ₅₀ (ErrTíp), pM	CE ₉₀ (ErrTíp), pM
OX40mAb24	6	312 (57.9)	78.1 (14.5)	312 (57.9)	2810 (521)
9B12	6	669 (137)	167 (34.3)	669 (137)	6020 (1230)

CE₂₀ = concentración eficaz que resulta en un 20% de efecto máximo; CE₅₀ = concentración eficaz semi-máxima; CE₉₀ = concentración eficaz que resulta en un 90% de efecto máximo; K_d = constante de disociación de unión en equilibrio; ErrTíp = error típico de la media.

2.6.2 Unión de OX40mAb24 a la Línea de células T Jurkat Modificada para Sobre-expresar OX40 Humano

OX40mAb24 unido a células T Jurkat que sobre-expresan OX40 con una K_d media de 424 pM y valores para un 20%, 50% y 90% de ocupación del receptor de 106, 424 y 3820 pM, respectivamente. Figura 3A-C y Tabla 2-3. No había diferencias estadísticamente significativas en la afinidad de unión aparente o la ocupación del receptor de OX40mAb24 a OX40 expresado por células T CD4⁺ humanas primarias activadas y células T Jurkat que sobre-expresan OX40 (p=0.59).

En comparación, 9B12 unía estas células T con una K_d media de 726 pM y valores para un 20%, 50% y 90% de ocupación del receptor de 182, 726 y 6540 pM, respectivamente (Figuras 3D-F, y Tabla 2-3). La relación entre los valores de K_d aparente para 9B12 y OX40mAb24 era, por lo tanto, de 1.7 a 1, similares a la relación calculada para la unión a OX40 en células T CD4⁺ humanas activadas.

Tabla 2-3 Afinidad Aparente (K_d) y Valores de Ocupación del Receptor para la Unión de OX40mAb24 o 9B12 a células Jurkat NFκB-luciferasa Clon 64 que sobre-expresan OX40 Humano

Unión Proteína	N experimentos	K_d (ErrTíp), pM	CE_{20} (ErrTíp), pM	CE_{50} (ErrTíp), pM	CE_{90} (ErrTíp), pM
OX40mAb 24	3	424 (173)	106 (43.3)	424 (173)	3820 (1560)
9B12	3	726 (308)	182 (76.9)	726 (308)	6540 (2770)

CE_{20} = concentración eficaz que resulta en un 20% de efecto máximo; CE_{50} = concentración eficaz semi-máxima; CE_{90} = concentración eficaz que resulta en un 90% de efecto máximo; K_d = constante de disociación de unión en equilibrio; ErrTíp = error típico de la media.

2.6.3 Unión de OX40mAb24 a células T CD4⁺ de Ratón o Rata

Ni OX40mAb24 ni 9B12 se unían a células T CD4⁺ de ratón o rata (datos no mostrados). La tinción positiva de células T CD4⁺ de ratón y rata se observó con anticuerpos OX40 anti-ratón y anti-rata comerciales, clones OX86 y OX40, respectivamente. 9B12 no se unía a células T CD4⁺ de ratón ni de rata activadas (datos no mostrados).

2.6.4 Unión de OX40mAb24 a células T CD4⁺ de Monos Cynomolgus y Rhesus

OX40mAb24 se unía a células de cynomolgus activadas con una K_d media de 581 pM. La K_d de cyno era 1.9 veces más alta que la K_d de seres humanos (Tabla 2-4).

9B12 se unía a las células T CD4⁺ de cyno activadas con una K_d de 1088 pM (Tabla 2-4), lo que resultó en una relación entre 9B12 y OX40mAb24 de valores K_d aparentes de 1.9 a 1.

OX40mAb24 se unía a células T CD4⁺ de mono rhesus con una K_d media de 369 pM (Tabla 2-4). La K_d de rhesus era 1.2 veces más alta que la K_d de seres humanos.

9B12 se unía a las células T CD4⁺ de mono rhesus activadas con una K_d de 713 pM (Tabla 2-4), lo que resulta en una relación entre 9B12 y OX40mAb24 de valores K_d aparentes no mostrados de 2.8 a 1.

Tabla 2-4 Afinidad Aparente (K_d) para la Unión de OX40mAb24 o 9B12 a células T CD4⁺ Primarias Activadas que expresan OX40 de Monos Cynomolgus y Rhesus

Proteína de unión	Cynomolgus		Rhesus	
	N experimentos	K _d (ErrTíp), pM	N experimentos	K _d (ErrTíp), pM
OX40mAb24	2	581 (238)	2	369 (236)
9B12	2	1088 (37)	2	713 (559)

K_d = constante de disociación de unión en equilibrio; ErrTíp = error típico de la media.

EJEMPLO 3: Especificidad de Unión de OX40mAb24 por OX40 Humano

En este ejemplo se realizaron ensayos de unión a células basados en la citometría de flujo para determinar la especificidad de OX40mAb24 por OX40 humano con relación a los otros miembros de la TNFRSF con secuencias de aminoácidos relacionadas, que incluían: NGFR (TNFRSF16), LTβR (TNFRSF3), TNFR2 (TNFRSF1β), GITR (TNFRSF18), CD137 (TNFRSF9) y HVEM (TNFRSF14). Además, se testó en formato ELISA la especificidad de unión de OX40mAb24 por miembros de la TNFRSF humana recombinante, que incluía los arriba mencionados, así como DR6 (TNFRSF21), osteoprotegerina (OPG;

TNFRSF11B), RANK (TNFRSF11A), FAS (TNFRSF6) y CD40 (TNFRSF5).

3.1 Materiales

Los materiales utilizados en este estudio se relacionan en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1 Materiales

	Elemento	Fuente
10	IgG anti-humana de cabra AlexaFluor® 647 (H+L)	Life Technologies, Carlsbad, CA
	lavador de placas BioTek®	BioTek®, Wincoski, VT
	Vector de expresión pCMV6-XL5 de CD137 (TNFRSF9)	Origene Technologies, Inc., Rockville, MD
15	Vector de expresión pCMV6-XL5 de GITR (TNFRSF18)	Origene Technologies, Inc., Rockville, MD
	Conjugado HRP de cadena ligera kappa de IgG anti-humana de cabra	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
20	Conjugado HRP (específico para Fab) de IgG anti-ratón de cabra	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
	Vector de expresión pCMV6-XL4 de HVEN (TNFRSF14)	Origene Technologies, Inc., Rockville, MD
25	Lipofectamine 2000	Life Technologies, Carlsbad, CA
	Isotipo AF488 dirigido contra IgG1 de ratón	Biolegend, San Diego, CA
	AF488 dirigido contra GITR humano	Ebioscience, San Diego, CA
30	AF647 dirigido contra NGFR humano	BD, San Jose, CA

	Elemento	Fuente
	CD137 anti-humano de APC	BD, San Jose, CA
	Isotipo APC dirigido contra IgG1 de ratón	Biolegend, San Diego, CA
5	Software Clone Manager v9	Sci-Ed Software, Cary, NC
	Suero bovino fetal (FBS), inactivado por calor	Life Technologies, Carlsbad, CA
	Vector de expresión pCMV6-XI.4 de LT β R (TNFRSF3)	Origene Technologies, Inc., Rockville, MD
10	Placa de fondo plano de 96 pocillos MaxiSorp	VWR, Radnor, PA
	Suero de ternero recién nacido, inactivado por calor	Life Technologies, Carlsbad, CA
15	Vector de expresión NGFR (TNFRSF16) pCMV6-XL5	Origene Technologies, Inc., Rockville, MD
	HVEM anti-humano PE	Ebioscience, San Diego, CA
	Lt β R anti-human PE	R&D systems, Minneapolis, MN
	PE dirigido contra TNFRSF 1B humano	BD, San Jose, CA
20	Isotipo PE dirigido contra IgG1 de ratón	Biolegend, San Diego, CA
	Isotipo PE dirigido contra Ig de rata	Ebioscience, San Diego, CA
25	PBS, pH 7.2 sin calcio ni magnesio	Life Technologies, Carlsbad, CA
	TNFRSF1 β (TNFRII) humano recombinante	R&D systems, Minneapolis, MN
	TNFRSF3 (LT β R) humano recombinante	R&D systems, Minneapolis, MN
30	TNFRSF4 (OX40) humano recombinante	R&D systems, Minneapolis, MN

	Elemento	Fuente
5	TNFRSF5 (CD40) humano recombinante	R&D systems, Minneapolis, MN
	TNFRSF6 (FAS) humano recombinante	R&D systems, Minneapolis, MN
	TNFRSF9 (CD137) humano recombinante	Proteína de la firma; lote n° AMPur19
10	TNFRSF11A (RANK) humano recombinante	R&D systems, Minneapolis, MN
	TNFRSF11B (OPG) humano recombinante	R&D systems, Minneapolis, MN
	TNFRSF14 (HVEM) humano recombinante	R&D systems, Minneapolis, MN
15	TNFRSF16 (NGFR) humano recombinante	R&D systems, Minneapolis, MN
	TNFRSF18 (GITR) humano recombinante	Proteína de la firma; lote n° LBPur0025
	TNFRSF21 (DR6) humano recombinante	R&D systems, Minneapolis, MN
20	Vector de expresión pCMV6-XL5 de TNFRSF1β	Origene Technologies, Inc., Rockville, MD
	Tween-20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

3.2 Métodos

25 3.2.1 Búsqueda de Proteínas con Estrecha Homología de la Secuencia con OX40 Humano

Con el fin de identificar proteínas humanas con identidad de la secuencia de aminoácidos con OX40 humano se realizó una búsqueda con la Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básica (BLASTP) utilizando la secuencia de proteínas de OX40 (CCDS 11 / UniProt P43489). Se

30 identificaron diecinueve miembros / isoformas de la familia

TNFRSF. Las secuencias de longitud completa de estas proteínas se verificaron utilizando las bases de datos tanto CCDS como UniProt (www.uniprot.org). Se utilizó el software Clone Manager versión 9 para realizar un alineamiento ensamblado frente a la referencia OX40 humano utilizando una matriz de puntuación blosum62 para determinar el porcentaje de identidad de aminoácidos entre OX40 humano y las proteínas identificadas en la búsqueda BLASTP (Tabla 3-2).

3.2.2 Especificidad de unión de OX40mAb24 por OX40 con relación a otros miembros de TNFRSF expresados en células HEK293

Construcciones de ADNc capaces de dirigir la expresión de miembros individuales de TNFRSF, cuando son transfectados en células de mamíferos, se obtuvieron de Origene Technologies, Rockville, MD. Estas construcciones de ADNc se amplificaron y purificaron por el grupo Protein Sciences a MedImmune en Gaithersburg, MD para uso en transfecciones transitorias. Para la expresión individual de cada uno de los miembros de TNFRSF, células HEK293 fueron transfectadas utilizando Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA) combinada con 0.5 µg de ADN de un vector de expresión que codifica uno de los miembros de TNFRSF, de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante para Lipofectamine 2000. Cuarenta y ocho horas post-transfección, las células se separaron de las placas de cultivo tisular mediante tripsinización. La tripsina se neutralizó mediante la adición de medio completo RPMI-1640 que contiene suero más FBS al 10%), seguido de la sedimentación de las células y lavados en medio completo. Las células se suspendieron después en tampón FACS (PBS + FBS al 2%) frío y se sembraron en placas tratadas con cultivo no tisular de 96 pocillos

para los estudios de unión con mAbs específicos para los miembros de TNFRSF (Tabla 3-3) y OX40mAb24.

Para la unión de anticuerpos u OX40mAb24, células HEK293 se sedimentaron, se retiró el tampón FACS y las células se suspendieron en tampón FACS que contenía 2 µg/mL de yoduro de propidio (PI) y un mAb marcado con fluorocromo, específico para el miembros de TNFRSF transfectado, a una concentración recomendada por el fabricante o con OX40mAb24 a una concentración de 1 µg/mL. Para los controles de unión, las células se incubaron por separado con anticuerpos control del isotipo marcados con fluorocromo. Las células se incubaron durante 1 hora a 4°C en la oscuridad. Después, las células incubadas con anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromo se lavaron en tampón FACS frío y luego se recogieron los eventos de unión y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA) y software FlowJo, tal como se describe en la Sección 3.2.3. Células incubadas con OX40mAb24 se lavaron en tampón FACS enfriado con hielo y luego se suspendieron 25 µg/mL de anticuerpo secundario de IgG (H+L) anti-humano de cabra Alexa Fluor® 647 y se incubaron durante 30 minutos más a 4°C en la oscuridad. Para un control de unión de anticuerpos secundarios, las células se incubaron en ausencia de OX40mAb24, pero en presencia de anticuerpo secundario solo marcado con flurocromo. Después, las células se lavaron y suspendieron en tampón FACS frío para el análisis en un citómetro de flujo LSRII.

3.2.3 Análisis por Citometría de Flujo

Los datos estándares de la citometría de flujo (FCS) se examinaron utilizando el software FlowJo (Ashland, OR). Para analizar la unión de mAb, las células se sincronizaron

primero para células viables (PI negativas) y luego se registró la intensidad de fluorescencia media (MFI) de eventos frente al número total de eventos para generar histogramas de unión . La MFI geométrica de todas las células viables se determinó para cada una de las muestras, de modo que se pudo determinar el múltiplo de MFI frente al fondo (control del isotipo o anticuerpo secundario solo),

3.2.4 Especificidad de unión ELISA de OX40mAb24

Se preparó una serie de dilución doble, de ocho puntos, de cada una de las proteínas de TNFRSF humanas recombinantes después de la dilución de proteínas patrón a razón de 5 µg/mL en PBS. Posteriormente, 50 µL de cada una de las diluciones de antígenos se transfirieron por duplicado a pocillos de una placa de fondo plano de 96 pocillos Nunc MaxiSorp, y se incubaron durante la noche a 4°C para adsorber proteínas a la placa. Después de ello, las placas se lavaron tres veces con PBS en un lavador de placas BioTek® para separar las proteínas no unidas. Anticuerpos anti OX40, mAb29, 9B12 y control se diluyeron en PBS hasta una concentración final de 10 µg/mL, y 50 µL se añadieron a cada uno de los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora para unir mAb a las proteínas unidas a la placa. Después, los pocillos se lavaron con PBS/Tween-20 al 0.1% (volumen/volumen) utilizando un lavador de placas BioTek®. Anticuerpos secundarios anti-humano de cabra o anti-ratón de cabra conjugados con HRP se añadieron a razón de 10 µg/mL a cada uno de los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de tres lavados en PBS/Tween-20 al 0.1%, se añadieron 50 µL de sustrato TMB a cada uno de los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos para desarrollar el producto

colorimétrico. Las reacciones se detuvieron añadiendo a los pocillos 50 µL de H₂SO₄ 0.5 molar, y las placas se leyeron inmediatamente a 450 nm utilizando un lector de placas Envision C para la detección del producto colorimétrico. Los resultados se representaron en el software GraphPad Prism para Windows, versión 5.01 y las curvas de unión se generaron utilizando análisis de regresión no lineal para la unión a un solo sitio.

3.3 Resultados

La búsqueda BLASTP de homología de las secuencias de proteínas en OX40 humano identificó 19 proteínas humanas de TNFRSF o isoformas que compartían 15-27% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de OX40 de longitud completa. Las proteínas y sus porcentajes de identidad de la secuencia se enumeran en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2 Identidad de la Secuencia de Aminoácidos de Doce Miembros de la TNFRSF con la Homología más Elevada a OX40 Humano

Miembro TNFRSF	Nombres alternativos	% de identidad con OX40	Proteína UniProt ID de la secuencia
TNFRSF11A	RANK, CD265	27	Q9Y6Q6 iso 2 (delta 7.8.9)
TNFRSF6B	DcR3	25	095407
TNFRSF18	GITR, AITR	25	Q9Y5U5 iso 2
TNFRSSF10C	DCR1, TRAIL-R3	24	014798

	Miembro TNFRSF	Nombres alternativos	% de identida d con 0X40	Proteína UniProt ID de la secuencia
5	TNFRSF5	CD40	23	P25942 iso 2
	TNFRSF18	GITR, AITR	23	Q9Y5U5 iso 3
	TNFRSF18	GITR, AITR	23	Q9Y5U5
10	TNFRSF9	CD137, 4-1BB	22	Q07011
	TNFRSF5	CD40	21	P25942
	TNFRSF14	TR2, HVEM-A	21	Q92956
	TNFRSF16	Receptor NGF	21	P08138
	TNFRSF3	LT β R, TNFR1III	20	P36941
15	TNFRSF6	Fas	20	P25445 iso 6 Tmdcl (A)
	TNFRSF6	Fas	20	P25445
20	TNFRSF3	LT β R, TNFR1III	19	P36941 iso 2
	TNFRSF6	Fas	19	P25445 iso 7 FasExo8De l
25	TNFRSF11B	Osteoprotegeri na	18	00030
	TNFRSF1B	TNFR1b, TNFR2, CD120b	18	P20333
30	TNFRSF11A	RANK, CD265	16	Q9Y6Q6

CCDS = secuencia codificadora consenso; ID =
 identificador; NA = no aplicable; TNFRSF = superfamilia del

receptor del factor de necrosis tumoral; UniProt - Universal Protein Resource

La unión de OX40mAb24 a células HEK293 transfectadas transitoriamente que expresaban NGFR, LT β R, TNFR2, GITR, CD137 o HVEM humano se evaluó mediante citometría de flujo tal como se describe en la Sección 3.1.3 anterior. La expresión en la superficie celular de NGFR, LT β R, TNFR2, GITR, CD137 y HVEM humano se confirmó utilizando anticuerpos comercialmente disponibles específicos para cada una de las proteínas de TNFRSF humanas; en la Tabla 3-3 se muestra el múltiplo de incremento en la MFI comparado con anticuerpos de control del isotipo para cada una de las proteínas de TNFRSF. La unión de OX40mAb24 a células HEK293 que expresaban NGFR, LT β R, TNFR2, GITR, CD137 y HVEM humano no estaba sustancialmente por encima de la observada para la unión del anticuerpo secundario solo a esas mismas células (Tabla 3-3, Figura 4A). En contraste, la unión de OX40mAb24 a una línea de células Jurkat que sobre-expresa constitutivamente OX40 era 48 veces mayor, por MFI media, que la unión de anticuerpo secundario solo marcado con fluorocromo (Tabla 3-3 y Figura 4B).

Tabla 3-3: Múltiplo de Unión de Anticuerpos Monoclonales esos para TNFRSF marcados con Fluorocromo y OX40mAb24 a Células Hek293 que sobre-expresan TNFRSF o OX40mAb24 a Células Jurkat que sobre-expresan OX40.

5	TNFRSF miembro expresado	Línea de Células Transferida con TNFRSF Miembro	Comercial Específico para Receptor unión de mAB (relación al isotipo Control MFI)	unión a OX40mAB24 (relación a anticuerpo secundario Ao10 MFI)
	OX40	Jurkat	ND	48
10	TNFRSF16 (NGFR)	HEK293	17	2.2
	TNFRSF3 (LT β R)	HEK293	146	1.0
	TNFRSF1 β	HEK293	5.0	1.0
15	TNFRSF18 (GITR)	HEK293	37	1.1
	TNFRSF9 (CD137)	HEK293	24	1.2
20	TNFRSF14 (HVEM)	HEK293	69	1.1

mAb = anticuerpo monoclonal; MFI = intensidad de fluorescencia media; ND = no determinado; TNFRSF = superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral

En un formato ELISA, la unión de un anticuerpo que contiene los brazos Fab de OX40mAB24, pero conteniendo el dominio Fc de IgG1 tres modificaciones de aminoácido (mAb29) era específica para OX40 (Figura 5A), no mostrando una unión específica por encima del fondo a NGFR (TNFRSF16), LT β R (TNFRSF3), TNFR2 (TNFRSF1 β), GITR (TNFRSF18), CD137 (TNFRSF9), HVEM (TNFRSF14), DR6 (TNFRSF21), osteoprotegerina (OPG; TNFRSF11B), RANK (TNFRSF11A), FAS (TNFRSF6) y CD40 (TNFRSF5) recombinante humano. 9B12, el anticuerpo

monoclonal de IgG1 OX40 anti-humano de ratón que se “humanizó” para crear OX40mAb24, demostró una carencia similar de unión a estas proteínas de TNFRSF (Figura 5B).

3.4: Conclusiones

5 Unión de OX40mAb24 y 9B12 a OX40 humano es específica y no reacciona de forma cruzada con proteínas de TNFRSF muy relacionadas.

EJEMPLO 4: Capacidad de OX40mAb24 para Co-estimular Células T CD4⁺ Humanas Primarias a través de OX40 *In Vitro*

10 En este ejemplo se evaluó la capacidad de OX40mAb24 de potenciar la activación de células T en combinación con la activación a través del complejo CD3/receptor de células T (TCR), utilizando un ensayo de proliferación de células T CD4⁺ humanas y de liberación de citoquinas basado en placa.
15 También se examinó la actividad de OX40mAb24 soluble, así como la actividad de OX40mAb24 soluble y unido en placa en ausencia de la señalización de CD3/TCR.

4.1 MATERIALES

20 Los materiales utilizados en este estudio se relacionan en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1 Materiales

Elemento	Fuente
IgG anti-humana de cabra AlexaFluor® 647 (H+L)	Life Technologies, Carlsbad, CA
EFluor450® de CD4 anti-humano	eBioscience, San Diego, CA
Albúmina de suero bovino (BSA)	Sigma, Saint Louis, MO
Kit de marcado de células CFSE	Life Technologies, Carlsbad, CA
Medio RPMI completo: RPMI-1640 + FBS al 10%	Materiales de Life Technologies, Carlsbad, CA

	Elemento	Fuente
	Placas de pocillos profundos, polipropileno, 2 ml	VWR, Radnor, PA
5	Kit de enriquecimiento en células T CD4 ⁺ EasySep	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC Canada
	Software FlowJo	TreeStar, Ashland, OR
	IgG anti-humana de cabra, Fcγ-específica	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA
10	IgG anti-ratón de cabra, Fcγ-específica	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA
	Suero de ternero recién nacido inactivado por calor	Life Technologies, Carlsbad, CA
	IL-2, recombinante humana	Preprotech, Rocky Hill, NJ
15	Leuko Pak	AllCells, Alameda, CA
	LSM	MP Biomedicals, Santa Ana, CA
	Citómetro de flujo LSR II	BD Biosciences, San Jose, CA
20	Anticuerpo CD3 anti-humano de ratón clon OKT3	Biolegend, San Diego, CA
	Suero de ternero recién nacido inactivado por calor	Life Technologies, Carlsbad, CA
25	Placas de 96 pocillos de fondo redondo tratadas con cultivo no tisular	VWR, Radnor, PA
	PHA-L	Roche Applied Science, Indianápolis, IN
30	Solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH7.2 sin calcio ni magnesio	Life Technologies, Carlsbad, CA

	Elemento	Fuente
	Software Prism , v 5.01	Graphpad Software, San Diego, CA
5	Yoduro de propidio (1 mg/mL de solución)	Sigma, Saint Louis, MO
	Kit de enriquecimiento en células T CD4 ⁺ RosetteSep	StemCell Technologies, Vancouver, BC Canadá
	RPMI-1640	Life Technologies, Carlsbad, CA
10	Matriz de detección multicitocinas Th1/Th2	Mesoscale Discovery (MSD), Rockville, MD
	Contador Vi-Cell	Beckman Coulter, Indianapolis, IN
15	Sangre completa, anticoagulada con heparina de sodio	MedImmune Blood Donor Program, Gaithersburg, MD

4.2 Ensayos

4.2.1 Bioactividad inmovilizada en placa de OX40mAb24

La bioactividad de OX40mAb24 se determinó midiendo la proliferación de células T CD4⁺ humanas y la producción de citoquina en un ensayo de captura de fármacos basado en placa (Figura 6).

Células T CD4⁺ humanas enriquecidas se aislaron de sangre entera de donantes sanos utilizando un kit de enriquecimiento de células T CD4⁺ RosetteSep, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los ensayos se realizaron con células de cuatro donantes independientes.

Células T CD4⁺ se suspendieron en medio de cultivo RPMI completo, y la concentración de células se ajustó a 1.0×10^6 por mL. Se añadieron concentraciones finales de 2 µg/mL de fitohemaglutinina-leucoaglutinina (PHA-L) y 20 UI/mL de

IL-2 humana recombinante, y las células se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂ en una incubadora de cultivo de tejidos humidificada durante 2 días para activar las células T y supra-regular OX40.

5 Placas de ensayo de 96 pocillos, de fondo redondo y tratadas con cultivo no tisular se recubrieron con 100 µL de 2 µg/mL de IgG Fcγ-específica anti-ratón de cabra y 2 µg/mL de IgG Fcγ-específica anti-humana de cabra en PBS. Anticuerpos de captura de IgG anti-humana de cabra no se
10 añadieron a los pocillos destinados para el ensayo de la actividad de OX40mAb24 soluble. Las placas se incubaron durante la noche a 4°C, se lavaron con 200 µL de PBS, y se bloquearon durante 90 minutos a 37°C con BSA al 1% en PBS (BSA al 1%/PBS). Las placas se lavaron con PBS y a las placas
15 se añadieron 2 ng/mL de CD3 anti-humano de ratón clon OKT3 reconstituido en BSA al 1%/PBS durante 90 minutos a 37°C. Las placas se lavaron con PBS para separar OKT3 no unido, OX40mAb24, mAb control de IgG1 humana R347, 9B12 y mAb
20 control de IgG1 de ratón clon MOPC-21, cada uno se reconstituyó en BSA al 1%/PBS partiendo de 0.918 µg/mL (3.0 nM) y se diluyeron en serie a lo largo de una serie de dilución triple y luego se añadieron a placas de ensayo y se incubaron durante 90 minutos a 37°C.

25 Células T CD4⁺ humanas primarias activadas se recogieron, lavaron en medio RPMI completo y la concentración se ajustó a 1.0 x 10⁶ células viables/mL. Las células se marcaron con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con
30 la excepción de utilizar CFSE 1.25 µM en oposición a los 5 µM recomendados con una incubación de 10 minutos a 37°C.

Después del marcaje, las células se suspendieron en medio RPMI completo y la concentración se ajustó a 0.5×10^6 por mL. Las placas se lavaron con PBS y 200 μ L de células T CD4⁺ (100.000/pocillo) se añadieron a cada uno de los pocillos.

5 Para los pocillos que contenían OX40mAb24 soluble, OX40mAb24 se diluyó en medio RPMI completo a las concentraciones finales más altas utilizadas para OX40mAb24 unido a placa. Las células en la placa se sedimentaron mediante centrifugación a 380 x g y se incubaron a 37°C durante 3

10 días. Después de un tiempo de incubación de 72 horas, se separaron 40 μ L de sobrenadante de cultivo celular para la medición de la liberación de citoquinas. Las células T CD4⁺ se sedimentaron y se lavaron una vez con PBS que contenía FBS al 2% (tampón FACS). Las células se suspendieron en

15 mezcla de unión que contenía anticuerpo marcado con eFluor450® CD4 anti-humano para la identificación de células T CD4⁺ y yoduro de propidio (PI) para la discriminación de células vivas/no viables, y se incubaron durante 30 minutos. Después de la incubación, las células se lavaron en tampón

20 FACS, se re-suspendieron en tampón FACS y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo LSRII y software FlowJo para el análisis de los datos formateados por citometría de flujo estándar (FCS).

Para analizar la proliferación de células T, se

25 sincronizaron eventos vivos (PI negativos) utilizando el software FlowJo, y el porcentaje de células sincronizadas con CD4 que muestra la dilución de CFSE se determinó como una medida del porcentaje de células sometidas a proliferación.

30 Para analizar la liberación de citoquinas, sobrenadantes del cultivo celular obtenidos después de 72

horas de cultivo se midieron para el contenido en citoquinas utilizando un kit de análisis de citoquinas Th1/Th2 humanas 10-plexo de MesoScale Discovery (Gaithersburg, MD) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Este kit emplea un
5 método de detección electroquímico para medir cuantitativamente las siguientes citoquinas humanas: IFN γ , IL-2, IL4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IL-13 e IL-1 β .

Se utilizó GraphPad Prism versión 5.01 para Windows, GraphPad Software, San Diego California EE.UU.,
10 www.graphpad.com, para representar el log de la concentración de mAb frente a los valores de proliferación o liberación de citoquinas. Las concentraciones efectivas que resultan en valores de un efecto máximo del 20%, 50% y 90% (CE₂₀, CE₅₀ y CE₉₀) para la bioactividad de OX40mAb24 se
15 calcularon para las curvas de bioactividad dosis-respuesta sigmoidales utilizando la función ECAanything.

4.3 RESULTADOS

En la Figura 7A-C y la Figura 8A-E se muestran datos de proliferación de cada uno de los cuatro donantes y datos de
20 liberación de citoquina de un donante. Los valores de potencia de CE₂₀, CE₅₀ y CE₉₀ para la proliferación de células T CD4⁺ se muestran en la Tabla 4-2; los valores de potencia para los ensayos de liberación de citoquinas de células T CD4⁺ primarias humanas en la Tabla 4-3 a la Tabla 4-7; valores
25 de proliferación media y de liberación de citoquinas para OX40mAb24 y 9B12 se muestran en la Tabla 4-8 y la Tabla 4-9, respectivamente.

Proliferación co-estimulada por OX40mAb24 de células T CD4⁺ primarias humanas (n=4) de una manera dependiente de la
30 concentración con valores CE₂₀, CE₅₀ y CE₉₀ de 21, 28 y 72 pM, respectivamente. Proliferación co-estimulada por 9B12 de

células T CD4⁺ con valores CE₂₀, CE₅₀ y CE₉₀ de 106, 218 y 622 pM. Por lo tanto, la relación de las concentraciones de 9B12 a OX40mAb24 requeridas para inducir un 50% de respuesta proliferativa máxima era 8 a 1 (Tabla 4-2).

5 Células T CD4⁺ primarias humanas co-estimuladas con OX40mAb24 y 9B12 para liberar citoquinas (n=4). Los valores medios de CE₂₀, CE₅₀ y CE₉₀ eran menos potentes que los valores para la proliferación, y se resumen en la Tabla 4-8 y la Tabla 4-9. No se pudo realizar un análisis de regresión no
10 lineal para los resultados del ensayo IL-2, IL-4, IL-8, IL-12 p70 e IL-1 β para los dos mAbs, debido a curvas de dosis-respuesta sigmoidales malamente formadas o no existentes.

Tabla 4-2 Valores medios de CE₂₀, CE₅₀ y CE₉₀ para OX40mAb24 y 9B12 en el Ensayo de Proliferación de células T CD4⁺

15 **Humanas Primarias**

Número de donante	Anticuerpo Monoclonal	CE ₂₀ (95% CI), pM	CE ₅₀ (95% CI), pM	CE ₉₀ (95% CI), pM	Actividad soluble	Actividad en ausencia de estimulación por TCR
20 367	OX40mAb24	32 (22, 46)	38 (20, 72)	71 (17, 29)	No Testado	Ninguno
25 661	OX40mAb24	33 (28, 39)	51 (33, 77)	128 (96, 172)	No Testado	Ninguno
30 645	OX40mAb24	7.5 (2.7, 21)	8.3 (2.8, 25)	35 (7.1, 173)	Ninguno	No Testado

5

Número de donante	Anticuerpo Monoclonal	CE ₂₀ (95% CI), pM	CE ₅₀ (95% CI), pM	CE ₉₀ (95% CI), pM	Actividad soluble	Actividad en ausencia de estimulación por TCR
651	OX40mAb24	9.6 (6.3, 15)	16 (9.1, 26)	54 (30, 99)	Ninguno	No Testado
10	<i>Media (Error Típico de la Media), pM</i>	<i>21 (6.9)</i>	<i>28 (9.8)</i>	<i>72 (20)</i>		
15						
367	9B12	99.8 (80.0, 125)	156 (90.2, 269)	337 (214, 530)	No Testado	No Testado
20	661	128 (113, 144)	237 (164, 342)	535 (464, 617)	No Testado	No Testado
25	645	77.5 (30.2, 199)	169 (67.0, 425)	686 (152, 3080)	No Testado	No Testado

30

Número de donante	Anticuerpo Monoclonal	CE ₂₀ (95% CI), pM	CE ₅₀ (95% CI), pM	CE ₉₀ (95% CI), pM	Actividad soluble	Actividad en ausencia de estimulación por TCR
651	9B12	118 (80.8 , 173)	309 (201, 475)	929 (511 , 1690)	No Testado	No Testado
Media (Error Típico de la Media), pM	9B12	106 (11.1)	218 (35.2)	622 (125)		

CI = intervalo de confianza; CE₂₀ = concentración eficaz que resulta en un 20% de efecto máximo; CE₅₀ = concentración eficaz semi-máxima; CE₉₀ = concentración eficaz que resulta en un 90% de efecto máximo; TCR = receptor de células T.

Tabla 4-3: Valores medios de CE₂₀, CE₅₀ y CE₉₀ para IFN γ Inducido por OX40mAb24 o 9B12 en el Ensayo de Bioactividad de células T CD4⁺ Humanas Primarias

5

10

15

20

25

30

Número de donante	Anticuerpo Monoclonal	CE ₂₀ (95% CI), pM	CE ₅₀ (95% CI), pM	CE ₉₀ (95% CI), pM	Actividad soluble	Actividad en ausencia de estimulación por TCR
367	OX40mAb24	38.6 (21.3 , 70.0)	57.2 (31.2 , 105)	106 (34.6 , 328)	No Testado	Ninguno
661	OX40mAb24	ND	ND	ND	No Testado	Ninguno
645	OX40mAb24	32.1 (20.8 , 49.7)	58.2 (42.0 , 80.8)	150 (77.6 , 289)	Ninguno	No Testado
651	OX40mAb24	47.5 (24.5 , 91.8)	77.4 (51.4 , 116)	168 (86.7 , 324)	Ninguno	No Testado
<i>Media (Error Típico de la Media), pM</i>	OX40mAb24	39.4 (4.46)	64.3 (6.57)	141 (18.4)		
367	9B12	ND	ND	ND	No Testado	No Testado
661	9B12	ND	ND	ND	No Testado	No Testado

5

10

15

20

25

30

Número de donante	Anticuerpo Monoclonal	CE ₂₀ (95% CI), pM	CE ₅₀ (95% CI), pM	CE ₉₀ (95% CI), pM	Actividad soluble	Actividad en ausencia de estimulación por TCR
645	9B12	706 (518, 963)	2380 (1420, 3970)	16300 (5480, 48300)	No Testado	No Testado
651	9B12	344 (274, 430)	758 (639, 900)	2660 (780, 3990)	No Testado	No Testado
<i>Media (Error Típico de la Media), pM</i>	9B12	525 (148)	1570 (662)	9480 (5569)		

CI = intervalo de confianza; CE₂₀ = concentración eficaz que resulta en un 20% de efecto máximo; CE₅₀ = concentración eficaz semi-máxima; CE₉₀ = concentración eficaz que resulta en un 90% de efecto máximo; TCR = receptor de células T.

Tabla 4-4: Valores medios de CE₂₀, CE₅₀ y CE₉₀ para TNF α Inducido por OX40mAb24 o 9B12 en el Ensayo de Bioactividad de células T CD4⁺ Humanas Primarias

5

10

15

20

25

30

Número de donante	Anticuerpo Monoclonal	CE ₂₀ (95% CI), pM	CE ₅₀ (95% CI), pM	CE ₉₀ (95% CI), pM	Actividad soluble	Actividad en ausencia de estimulación por TCR
367	OX40mAb24	ND	ND	ND	No Testado	Ninguno
661	OX40mAb24	ND	ND	ND	No Testado	Ninguno
645	OX40mAb24	37.6 (22.5 , 62.7)	54.1 (29.1 , 101)	96.2 (26.7 , 347)	Ninguno	No Testado
651	OX40mAb24	ND	ND	ND	Ninguno	No Testado
<i>Media (Error Típico de la Media), pM</i>	OX40mAb24	ND	ND	ND		
367	9B12	ND	ND	ND	No Testado	No Testado
661	9B12	ND	ND	ND	No Testado	No Testado
645	9B12	306 (258, 503)	670 (527, 853)	1800 (1100 , 2920)	No Testado	No Testado

5	Número de donante	Anticuerpo Monoclonal	CE₂₀ (95% CI), pM	CE₅₀ (95% CI), pM	CE₉₀ (95% CI), pM	Actividad soluble	Actividad en ausencia de estimulación por TCR
	651	9B12	388 (300, 502)	764 (640, 919)	2260 (1500, 3410)	No Testado	No Testado
10	<i>Media (Error Típico de la Media), pM</i>	9B12	347 (33.5)	717 (38.4)	2030 (188)		
15							

CI = intervalo de confianza; CE₂₀ = concentración eficaz que resulta en un 20% de efecto máximo; CE₅₀ = concentración eficaz semi-máxima; CE₉₀ = concentración eficaz que resulta en un 90% de efecto máximo; ND = no determinado debido a un deficiente ajuste de la curva (CE₂₀, CE₅₀, CE₉₀) o carencia de valores suficientes para determinar la media y el error típico de la media; TCR = receptor de células T.

Tabla 4-5: Valores medios de CE₂₀, CE₅₀ y CE₉₀ para IL10 Inducida por OX40mAb24 o 9B12 en el Ensayo de Bioactividad de células T CD4⁺ Humanas Primarias

5

10

15

20

25

30

Número de donante	Anticuerpo Monoclonal	CE ₂₀ (95% CI), pM	CE ₅₀ (95% CI), pM	CE ₉₀ (95% CI), pM	Actividad soluble	Actividad en ausencia de estimulación por TCR
367	OX40mAb24	41.6 (17.8 , 97.0)	59.5 (25.4 , 139)	105 (25.0 , 440)	No Testado	Ninguno
661	OX40mAb24	63.5 (29.6 , 136)	89.5 (64.2 , 125)	154 (93.3 , 255)	No Testado	Ninguno
645	OX40mAb24	ND	ND	ND	Ninguno	No Testado
651	OX40mAb24	53.0 (31.0 , 90.6)	86.4 (65.0 , 115)	188 (110, 321)	Ninguno	No Testado
Media (Error Típico de la Media), pM	OX40mAb24	52.7 (6.32)	78.5 (9.53)	149 (24.1)		
367	9B12	130 (83.3 , 204)	198 (139, 284)	385 (224, 662)	No Testado	No Testado
661	9B12	ND	ND	ND	No Testado	No Testado

5

10

15

20

Número de donante	Anticuerpo Monoclonal	CE ₂₀ (95% CI), pM	CE ₅₀ (95% CI), pM	CE ₉₀ (95% CI), pM	Actividad soluble	Actividad en ausencia de estimulación por TCR
645	9B12	528 (363, 767)	1220 (858, 1740)	4630 (2050, 10400)	No Testado	No Testado
651	9B12	405 (300, 547)	796 (649, 976)	2320 (1440, 3730)	No Testado	No Testado
<i>Media (Error Típico de la Media), pM</i>	9B12	354 (118)	738 (296)	2445 (1227)		

25

CI = intervalo de confianza; CE₂₀ = concentración eficaz que resulta en un 20% de efecto máximo; CE₅₀ = concentración eficaz semi-máxima; CE₉₀ = concentración eficaz que resulta en un 90% de efecto máximo; ND = no determinado debido a un deficiente ajuste de la curva (CE₂₀, CE₅₀, CE₉₀) o carencia de valores suficientes para determinar la media y el error típico de la media; TCR = receptor de células T.

30

Tabla 4-6: Valores medios de CE₂₀, CE₅₀ y CE₉₀ para IL13 Inducida por OX40mAb24 o 9B12 en el Ensayo de Bioactividad de células T CD4⁺ Humanas Primarias

5

10

15

20

25

30

Número de donante	Anticuerpo Monoclonal	CE ₂₀ (95% CI), pM	CE ₅₀ (95% CI), pM	CE ₉₀ (95% CI), pM	Actividad soluble	Actividad en ausencia de estimulación por TCR
367	OX40mAb24	ND	ND	ND	No Testado	Ninguno
661	OX40mAb24	ND	ND	ND	No Testado	Ninguno
645	OX40mAb24	44.7 (26.5, 75.5)	73.8 (52.2, 104)	163 (93.3, 286)	Ninguno	No Testado
651	OX40mAb24	36.2 (24.9, 52.7)	65.0 (49.6, 85.3)	164 (99.2, 273)	Ninguno	No Testado
<i>Media (Error Típico de la Media), pM</i>	OX40mAb24	40.5 (4.25)	69.4 (4.40)	164 (0.50)		
367	9B12	ND	ND	ND	No Testado	No Testado
661	9B12	154 (841, 283)	238 (166, 341)	472 (278, 800)	No Testado	No Testado

5	Número de donante	Anticuerpo Monoclonal	CE₂₀ (95% CI), pM	CE₅₀ (95% CI), pM	CE₉₀ (95% CI), pM	Actividad soluble	Actividad en ausencia de estimulación por TCR
10	645	9B12	1100 (413, 2910)	5450 (1060, 2800)	6930 (4310, 1110000)	No Testado	No Testado
	651	9B12	495 (324, 756)	1770 (896, 3510)	13400 (2980, 60400)	No Testado	No Testado
15	<i>Media (Error Típico de la Media), pM</i>	9B12	583 (277)	2486 (1550)	6930 (3730)		

20 CI = intervalo de confianza; CE₂₀ = concentración eficaz que resulta en un 20% de efecto máximo; CE₅₀ = concentración eficaz semi-máxima; CE₉₀ = concentración eficaz que resulta en un 90% de efecto máximo; ND = no determinado debido a un deficiente ajuste de la curva (CE₂₀, CE₅₀, CE₉₀) o carencia de valores suficientes para determinar la media y el error típico de la media; TCR = receptor de células T.

Tabla 4-7: Valores medios de CE₂₀, CE₅₀ y CE₉₀ para IL5 Inducida por OX40mAb24 o 9B12 en el Ensayo de Bioactividad de células T CD4⁺ Humanas Primarias

5

10

15

20

25

30

Número de donante	Anticuerpo Monoclonal	CE ₂₀ (95% CI), pM	CE ₅₀ (95% CI), pM	CE ₉₀ (95% CI), pM	Actividad soluble	Actividad en ausencia de estimulación por TCR
367	OX40mAb24	33.2 (21.2 , 52.1)	46.7 (24.7 , 88.0)	79.8 (12.3 , 519)	No Testado	Ninguno
661	OX40mAb24	43.4 (27.6 , 68.4)	69.0 (49.7 , 95.7)	144 (86.8 , 238)	No Testado	Ninguno
645	OX40mAb24	ND	ND	ND	Ninguno	No Testado
651	OX40mAb24	56.2 (35.5 , 88.9)	95.9 (76.1 , 121)	224 (128, 391)	Ninguno	No Testado
Media (Error Típico de la Media), pM	OX40mAb24	44.3 (6.65)	70.5 (14.2)	149 (41.7)		
367	9B12	ND	ND	ND	No Testado	No Testado
661	9B12	ND	ND	ND	No Testado	No Testado
645	9B12	ND	ND	ND	No Testado	No Testado

5

10

15

Número de donante	Anticuerpo Monoclonal	CE ₂₀ (95% CI), pM	CE ₅₀ (95% CI), pM	CE ₉₀ (95% CI), pM	Actividad soluble	Actividad en ausencia de estimulación por TCR
651	9B12	423 (285, 627)	1090 (742, 1600)	4870 (1900, 12500)	No Testado	No Testado
<i>Media (Error Típico de la Media), pM</i>	9B12	ND	ND	ND		

20

25

CI = intervalo de confianza; CE₂₀ = concentración eficaz que resulta en un 20% de efecto máximo; CE₅₀ = concentración eficaz semi-máxima; CE₉₀ = concentración eficaz que resulta en un 90% de efecto máximo; ND = no determinado debido a un deficiente ajuste de la curva (CE₂₀, CE₅₀, CE₉₀) o carencia de valores suficientes para determinar la media y el error típico de la media; TCR = receptor de células T.

Tabla 4-8: Sumario de los Valores medios de CE₂₀, CE₅₀ y CE₉₀ para la Proliferación y Liberación de Citoquinas para OX40mAb24

30

5	Lectura de la Bioactividad	CE ₂₀	CE ₅₀	CE ₉₀
		(ErrTíp), pM	(ErrTíp), pM	(ErrTíp), pM
	Proliferación de células T CD4	21 (6.9)	28 (98)	72 (20)
	Liberación de IFN γ	39.4 (4.46)	64.3 (6.57)	141 (18.4)
	Liberación de TNF α	ND	ND	ND
10	IL10	52.7 (6.32)	78.5 (9.53)	149 (24.1)
	IL13	40.5 (4.25)	69.4 (4.40)	164 (0.50)
	IL5	44.3 (6.65)	70.5 (14.2)	149 (41.7)

CE₂₀ = concentración eficaz que resulta en un 20% de efecto máximo; CE₅₀ = concentración eficaz semi-máxima; CE₉₀ = concentración eficaz que resulta en un 90% de efecto máximo; ND = no determinado debido a un insuficiente valor n para calcular una media y el error típico de la media; ErrTíp = error típico de la media.

Tabla 4-9: Sumario de los Valores medios de CE₂₀, CE₅₀ y CE₉₀ para la Proliferación y Liberación de Citoquinas para 9B12

25	Lectura de la Bioactividad	CE ₂₀	CE ₅₀	CE ₉₀
		(ErrTíp), pM	(ErrTíp), pM	(ErrTíp), pM
	Proliferación de células T CD4	106 (11.1)	218 (35.2)	622 (125)
	Liberación de IFN γ	525 (148)	1570 (662)	9480 (5569)
	Liberación de TNF α	347 (33.5)	717 (38.4)	2030 (188)
30	IL10	354 (118)	738 (296)	2445 (1227)

Lectura de la Bioactividad	CE₂₀ (ErrTíp), pM	CE₅₀ (ErrTíp), pM	CE₉₀ (ErrTíp), pM
IL13	583 (277)	2486 (1547)	6934 (3732)
IL5	ND	ND	ND

5 CE₂₀ = concentración eficaz que resulta en un 20% de efecto máximo; CE₅₀ = concentración eficaz semi-máxima; CE₉₀ = concentración eficaz que resulta en un 90% de efecto máximo; ND = no determinado debido a un insuficiente valor n para calcular una media y el error típico de la media; ErrTíp =
10 error típico de la media.

Se determinó la actividad de OX40mAb24 soluble, no unido a placa. OX40mAb24 soluble no inducía una proliferación de células T CD4⁺ humanas primarias (Figura 7A-C) ni la liberación de citoquinas (Figura 8A-E) por encima de los
15 niveles observados para el anticuerpo anti-CD3 solo o en presencia de mAb control IgG1 humano R347. El anticuerpo anti-CD3 solo unido a placa producía un nivel de mínimo a moderado de proliferación y liberación de citoquinas. La
20 carencia de actividad demostrada aquí por parte de OX40mAb24 soluble está en concordancia con la ausencia de actividad observada para OX40mAb24 soluble sin reticulación basada en células en un ensayo de bioactividad de 2 células que medía la señalización de NFκB mediada por OX40 (véase el Ejemplo 5 que figura más adelante).

25 De igual manera, OX40mAb24, inmovilizado sobre la superficie de la placa o añadido como una proteína no unida soluble, en ausencia de una señal de anticuerpo anti-CD3 sub-mitogénico inducía de poca a ninguna proliferación de células T CD4⁺ (Figura 7A-C) o la liberación de citoquinas
30 (Figura 8A-E). Estos resultados demuestran que, en este estudio, OX40mAb24 no tiene actividad en células T CD4⁺

humanas primarias en ausencia de un ligamiento CD3/TCR simultáneo.

4.4 Conclusiones

OX40mAB24 inducía la proliferación y liberación de
5 citoquinas de células T CD4⁺ humanas primarias de una manera dependiente de la dosis, similar a la del anticuerpo del que se inmunizó 9B12 (Figura 8A-E y Figura 9A-E). OX40mAB24 demostró actividad como una proteína unida a placa pero no como una soluble. Además, la actividad de OX40mAb24 se
10 producía de forma concurrente con la señalización de CD3/TCR.

EJEMPLO 5: Determinación de la Actividad *In Vitro* de OX40mAb24 en Ensayos de Bioactividad Basados en 2 células Utilizando células T Informadoras NFκB-luciferasa Jurkat

En este ejemplo se evaluó la capacidad de OX40mAb24 y
15 9B12 de señalizar a través de OX40 humano, utilizando ensayos de bioactividad informadora de dos células La medición de la activación de células T a través de la co-estimulación de OX40 se consiguió utilizando una línea informadora de células T NFκB-luciferasa Jurkat que sobre-expresa OX40 que
20 produce luciferasa en respuesta a la estimulación de la vía de señalización de NFκB (Figura 10). Se ha informado que la señalización de NFκB se produce aguas abajo de la aplicación de OX40 y puede correlacionarse con otras medidas de la activación de células T tales como la proliferación y
25 liberación de citoquinas (Croft M, *et al.*, *Immunol Rev.* 229:173-91 (2009)). La cantidad de luciferasa y, por lo tanto, la activación de células T, se midió añadiendo un sustrato de luciferasa a lisados de células y midiendo la
30 luz emitida por el producto de reacción utilizando un luminómetro. Se midió la bioactividad de OX40mAb24 reticulada utilizando células modificadas para expresar

diferentes complementos de receptor Fc γ , así como OX40mAb24 soluble, no reticulado con Fc γ R.

5.1 Materiales

Los materiales utilizados en este estudio se relacionan en la Tabla 5-1.

Tabla 5-1: Materiales

	Elemento	Fuente
10	Microperlas de linfocitos CD45 ⁺	Miltenyi, San Diego, CA
	Colagenasa III	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ
	DNasa I, de páncreas bovino	Sigma, Saint Louis, MO
15	EDTA, 0.5M pH 8.0	Life Technologies, Carlsbad, CA
	Lector de luminiscencia Envision	Perkin Elmer, Waltham, MA
20	Suero de ternero recién nacido (FBS) inactivado por calor	Life Technologies, Carlsbad, CA
	Columna LS	Miltenyi, San Diego, CA
	Tampón MACS: PBS + BSA al 0.5% + EDTA 2 mM	Materiales de Life Technologies, Carlsbad, CA
25	Placas de 96 pocillos de fondo redondo no tratadas con TC	VWR, Radnor, PA
	Software Prism v5.01	GraphPad, San Diego, CA
30	Disolución de Ensayo de Luciferasa Steady-Glo	Promega, Madison, WI

Elemento	Fuente
Contador ViCell	Beckman Coulter, Indianapolis, IN

5.2 Ensayo de Bioactividad de Dos células

5.2.1 Aislamiento de células CD45⁺ Humanas Primarias

Células CD45⁺ humanas primarias se aislaron de tumores humanos. Muestras de los tumores se retiraron de los medios de transporte y se colocaron en placas de Petri estériles. Se añadió Solución Salina Tamponada de Hank y se diseccionó de la muestra de tumor tejido necrótico visible y cualquier tejido normal. El tejido se desmenuzó en pequeños trozos (~1 mm) y se colocó en un tubo cónico de 50 mL, y se añadió una mezcla de enzimas Colagenasa III (250 UI/mL de colagenasa III, CaCl₂ 3 mM, 315 µg/mL de DNAasa 1), se mezcló e incubó. La muestra digerida se filtró a través de un filtro de 70 micras y se lavó con tampón MACS. Las células disociadas se sedimentaron y se determinaron el número de células y la viabilidad utilizando un contador ViCell. Las células se suspendieron en tampón MACS con microperlas CD45 y se incubaron en hielo. Las células se lavaron y re-suspendieron en tampón MACS para la selección positiva de células CD45⁺ utilizando una columna LS. Las células CD45⁺ unidas a las perlas se eluyeron separando la columna del imán y añadiendo tampón MACS a la columna. Las células se sedimentaron y se re-suspendieron en medio RPMI completo y se utilizaron en ensayos de bioactividad tal como se describe arriba.

5.2.2 Protocolo del Ensayo

OX40mAb24 y 9B12 se sometieron a ensayo en cuanto a la bioactividad utilizando un ensayo de bioactividad de 2 células. El clon 64 informador de NFκB-luciferasa Jurkat que sobre-expresa OX40 humano (informador Jurkat OX40) se

utilizó para medir el agonismo de OX40 (actividad de NFκB). Se utilizó una segunda línea celular que expresa FcγR para mediar en la reticulación de OX40mAb24 que agrupa y activa OX40 en las células informadoras Jurkat de OX40 (Figura 10).

5 Las líneas celulares que expresan FcγR utilizadas para reticular incluían la línea de linfoma de células B humana Raji, HEK293 que expresan CD32A, HEK293 que expresan CD32B o células inmunes CD45⁺ aisladas de tumores humanos primarios.

10 Para determinar la actividad soluble de OX40mAb24 se realizaron también ensayos de bioactividad utilizando células HEK293 parentales, que son FcγR nulas y, por lo tanto, son incapaces de reticular OX40mAb24, o en ausencia de células reticulantes en total.

15 Antes del uso, células informadoras Jurkat de OX40 se cultivaron en medio RPMI completo en una incubadora de cultivos de tejidos a una densidad de 0.5-1.5 x 10⁶ por mL. Se hicieron pasar las células el día antes del bioensayo a una densidad final de 10⁶ células por mL.

20 Células informadoras Jurkat de OX40, líneas celulares que expresan FcγR, o células parentales HEK se recogieron y se sedimentaron. Para aislar células CD45⁺ de tumores humanos primarios y tejidos adyacentes normales, los tejidos se disociaron y las células CD45⁺ se aislaron y re-suspendieron en medio RPMI completo para uso en ensayos de bioactividad, tal como se describe más adelante.

25 OX40mAb24, 9B12 y diversos anticuerpos control se diluyeron en serie 3 veces en medio RPMI completo.

30 Células informadoras Jurkat de OX40 más células que expresan FcγR, o células parentales HEK, se añadieron a una placa de 96 pocillos a razón de 100.000 células por pocillo.

OX40mAb24, 9B12 o anticuerpos control se añadieron a células en una serie de dilución con una concentración de partida de 10 µg/mL, y se incubaron a 37°C en una incubadora de cultivo de tejidos.

5 Después de un tiempo de incubación de 16-24 horas, se añadieron a cada uno de los pocillos 100 µL de disolución de ensayo de luciferasa reconstituida Steady-Glo (Promega, Madison, WI) y se mezclaron para lisar las células y luego se incubaron para equilibrar la señal de luciferasa. El
10 lisado Steady-Glo/muestra (150 µL) se transfirió de cada uno de los pocillos a una placa de ensayo de paredes blancas, de 96 pocillos, para la detección y la lectura de luminiscencia utilizando un lector de luminiscencia Envision de Perkin Elmer.

15 Se utilizó GraphPad Prism versión 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA), para representar la concentración de OX40mAb24, 9B12, IgG1 humana R347, clon MOPC-21 de IgG1 de ratón (el eje x es el log 10 de la concentración de proteínas) frente a la luminiscencia RLU
20 (eje y). Los valores de CE₂₀, CE₅₀ y CE₉₀ para la bioactividad se determinaron utilizando ECAnything (ECf) para f=20, f=50 y f=90 de curvas de bioactividad de dosis-respuesta sigmoidales (pendiente variable)).

5.3 Resultados de Ensayos de Bioactividad de 2 células

25 Los resultados para la bioactividad de OX40mAb24 y anticuerpos control se muestran en la Figura 11A-D, Figura 12A-D y Tabla 5-2.

En presencia de una línea celular que expresa FcγR (*p. Ej.,*, HEK293 que expresa CD32A, HEK293 que expresa CD32AB,
30 células B Raji o células CD45⁺ aisladas de tumores humanos primarios), OX40mAb24 demostró una potente estimulación de

células informadoras NFκB Jurkat que sobre-expresan OX40, tal como se mide por la activación de la NFκB. En ausencia de un segundo tipo de célula o en presencia de células HEK293 que carecen de FcγRs expresados exógenamente, OX40mAb24 exhibía una actividad informadora mínima Figura 11A-D).

Se resumen los valores de potencia (CE₂₀, CE₅₀, y CE₉₀) para los bioensayos de dos células en la Tabla 5-2. Los valores medios de CE₂₀, CE₅₀ y CE₉₀ a lo largo de todos los ensayos eran 228, 751 y 5630 pM, respectivamente.

Los resultados para la bioactividad de 9B12 y anticuerpos control se muestran en la Figura 12A-D, y los valores de potencia se resumen en la Tabla 5-3. Los valores medios de CE₂₀, CE₅₀ y CE₉₀ a lo largo de todos los ensayos eran 519, 2530 y 41100 pM, respectivamente. Por lo tanto, se calculó que la relación de bioactividad de 2 células (CE₅₀) para 9B12 con respecto a la de OX40mAb24 era 3.4 a 1.

Tabla 5-2: Bioactividad de dos células de OX40mAb24

Número de experimento	Célula que expresa FcγR *	CE ₂₀ (95% CI) pM	CE ₅₀ (95% CI) pM	CE ₉₀ (95% CI) pM
1	Raji	298 (236, 378)	1140 (982, 1340)	9850 (6500, 14300)
2	HEK que expresa CD32A	104 (78.8, 138)	437 (370, 517)	4250 (2900, 6240)
3	HEK que expresa CD32A	100 (79.5, 126)	322 (281, 370)	2060 (1530, 2780)

	Número de experimento	Célula que expresa FcγR *	CE ₂₀ (95% CI) pM	CE ₅₀ (95% CI) pM	CE ₉₀ (95% CI) pM
5	4	Raji	350 (259, 467)	1040 (855, 1270)	5930 (3740, 9400)
10	5	HEK que expresa CD32B	90.6 (75.4, 109)	270 (242, 301)	1520 (1200, 1920)
	6	Raji	180 (109, 296)	796 (577, 1100)	8410 (3820, 18500)
15	7	HEK que expresa CD32B	280 (198, 394)	899 (710, 1140)	5730 (3290, 9970)
	8	HEK que expresa CD32B	237 (196, 286)	671 (592, 762)	3510 (2630, 4670)
20	9	Raji	676 (443, 1030)	1320 (970, 1800)	3820 (2000, 7320)
	10	Raji	297 (127, 694)	1260 (666, 2390)	12500 (2570, 60500)
25	11	HEK que expresa CD32B	144 (113, 184)	700 (598, 818)	8540 (5770, 12600)
30	12	Células CD45 ⁺ , NSCLC	33.6 (24.7, 45.8)	81.6 (68.5, 97.3)	334 (236, 471)

Número de experimento	Célula que expresa FcγR *	CE ₂₀ (95% CI) pM	CE ₅₀ (95% CI) pM	CE ₉₀ (95% CI) pM
5 13	Células CD45 ⁺ , RCC	92.2 (75.4, 113)	337 (296, 383)	2630 (1940, 3550)
10 14	Células CD45 ⁺ , NSCLC	247 (207, 295)	772 (688, 867)	4700 (3600, 6140)
10 15	Células CD45 ⁺ , RCC	351 (155, 798)	1410 (782, 2530)	12700 (2960, 54500)
15 16	HEK que expresa CD32A	166 (145, 191)	553 (507, 603)	3720 (3060, 4530)
20	Media (Error Típico de la Media)	228 (38.9)	751 (101)	5630 (937)

NSCLC = cáncer de pulmón de células no pequeñas; RCC = carcinoma de células renales

* Tal como se indica, los ensayos utilizaban Raji, células HEK293 que expresan CD32A, células HEK293 que expresan CD32B o células CD45⁺ aisladas de muestras de tumores humanos primarios con células informadoras del clon 64 de NFκB-luciferasa Jurkat que sobre-expresan OX40.

Tabla 5-3: Bioactividad de dos células de 9B12

	Número de experimento	Célula que expresa FcγR *	CE ₂₀ pM	CE ₅₀ pM	CE ₉₀ pM
5	1	Raji	1110 (791, 1570)	9280 (4460, 19300)	267000 (57900, 1230000)
10	2	HEK que expresa CD32A	74.1 (53.0, 104)	338 (279, 410)	3760 (2440, 5790)
	3	HEK que expresa CD32A	66.7 (43.3, 103)	225 (175, 289)	1550 (914, 2630)
15	4	Raji	1040 (834, 1300)	5040 (3880, 6550)	61200 (32200, 116000)
	5	HEK que expresa CD32B	249 (206, 303)	726 (641, 823)	3950 (2980, 5240)
20	6	Raji	548 (408, 736)	2700 (2070, 3620)	33700 (17000, 66700)
	7	HEK que expresa CD32B	585 (520, 658)	1770 (1620, 1930)	10200 (8280, 12500)
25	8	HEK que expresa CD32B	518 (449, 598)	1340 (1210, 1480)	6050 (4800, 7630)
30	9	Raji	872 (504, 1510)	3070 (1910, 4950)	22600 (7000, 73100)

	Número de experimento	Célula que expresa FcγR *	CE ₂₀ pM	CE ₅₀ pM	CE ₉₀ pM
5	10	Raji	571 (212, 1540)	3330 (1080, 10200)	54400 (3400, 872000)
10	11	HEK que expresa CD32B	650 (458, 923)	2360 (1790, 3100)	18200 (9200, 36000)
	12	Células CD45 ⁺ , NSCLC	104 (76.3, 143)	223 (185, 269)	741 (501, 1100)
15	13	Células CD45 ⁺ , RCC	ND	ND	ND
	14	Células CD45 ⁺ , NSCLC	ND	ND	ND
20	15	Células CD45 ⁺ , RCC	356 (132, 964)	2420 (938, 6250)	50500 (4140, 616000)
25		Media (Error Típico de la Media)	519 (96.2)	2530 (687)	41100 (19700)

ND = no determinado; NSCLC = cáncer de pulmón de células no pequeñas; RCC = carcinoma de células renales

* Tal como se indica, los ensayos utilizaban Raji, células HEK293 que expresan CD32A, células HEK293 que expresan CD32B o células CD45⁺ aisladas de muestras de tumores humanos primarios con células informadoras del clon 64 de NFκB-luciferasa Jurkat que sobre-expresan OX40.

5-4: Conclusiones

OX40mAb24 y 9B12 median en la activación de células T humanas según se mide por la estimulación de la vía de NFκB en la línea de células informadoras de NFκB-luciferasa Jurkat que sobre-expresan OX40. En ausencia de células que expresan FcγRs capaces de reticular a través de los dominios Fc de OX40mAb24, se midió una actividad mínima de la línea de células informadora. Sin embargo, en un sistema de 2 células que comprenden células que expresan FcγR que son capaces de reticular el mAb y una línea de células informadoras de NFκB-luciferasa que sobre-expresan Jurkat para la lectura de la activación de células T, OX40mAb24 y 9B12 mediaron en una potente activación de OX40 con valores CE₅₀ de 751 pM y 2530 pM, respectivamente. Por lo tanto, la bioactividad de OX40mAb24 en el sistema de ensayo de 2 células era similar a la de 9B12.

EJEMPLO 6: Capacidad de OX40mAb24 de Desencadenar la Función Efectora

En este ejemplo, OX40mAb24 se evaluó con respecto a su capacidad de desencadenar la función efectora de Fc, a saber, la capacidad de OX40mAb24 de desencadenar una citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) mediada por células asesinas naturales (NK) contra células T CD4⁺ humanas primarias que expresan altos niveles de OX40, o de unirse a C1q, un requisito previo para la citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDC) por la vía clásica del complemento. Versiones de OX40mAb24 que contienen un dominio Fc de IgG4P humano (mAb28) o una mutación triple en el dominio Fc de IgG1 que reduce la unión de Fcγ RIIIa (mAb29) se utilizaron para evaluar la contribución del dominio Fc de IgG1 de OX40mAb24 para mediar en la actividad de ADCC.

También, las funciones efectoras de OX40mAb24 se compararon con las de 9B12, un anticuerpo monoclonal IgG1 OX40 anti-humano de ratón que se humanizó para crear OX40mAb24. El anticuerpo dirigido contra CD20 rituximab se une a células B que expresan CD20 y se utilizó como un control positivo para los experimentos de ADCC Dado que las células T CD4⁺ humanas activadas primarias no expresan CD20, se realizó un ensayo separado utilizando la línea celular Toledo B, que expresa CD20, para validar la actividad de células NK utilizadas en el sistema de ensayo ADCC.

6.1 MATERIALES

Los materiales utilizados en este estudio se relacionan en la Tabla 7-1.

Tabla 6-1: Materiales

15	Elemento	Fuente
	Proteína C1q del complemento	Ebioscience, San Diego, CA
	Medio RPMI completo: RPMI-1640 + FBS al 10%	Materiales de Life Technologies, Carlsbad, CA
20	Medio DM-L	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC Canada
	Chip biosensor GLC	Bio-Rad, Hercules, CA
	Software FlowJo	FlowJo, Ashland, OR
	IL-2, recombinante humana	Preprotech, Rocky Hill, NJ
	Citómetro de flujo LSR II	BD Biosciences, San Jose, CA
25	Software Prism , v 5.01	Graphpad Software, San Diego, CA
	Yoduro de propidio (1 mg/mL de solución)	Sigma, Saint Louis, MO
	Software ProteOn Manager 2.1	Bio-Rad, Hercules, CA
30	Instrumento ProteOn XPR36	Bio-Rad, Hercules, CA

5	Kit de enriquecimiento de células T CD4 RosetteSep	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC Canada
	Enriquecimiento de células NK humanas RosetteSep	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC Canada
	Contador ViCell	Beckman Coulter, Indianapolis, IN
	Disolución de marcaje de células Vybrant Dio	Life Technologies, Carlsbad, CA
	Sangre entera, anticoagulada con heparina de sodio	MedImmune Blood Donor Program, Gaithersburg, MD

6.2 Ensayos

6.2.1 Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

Se testó la actividad ADCC de OX40mAb24 con relación a la 9B12 y anticuerpos monoclonales que contienen los brazos Fab de OX40mAb24 con un dominio Fc de IgG4P o un mutante triple (TM) del dominio Fc de IgG1 humana, utilizando células NK humanas primarias enriquecidas como efectores y células T CD4⁺ humanas primarias que expresan OX40 como dianas. Como un control positivo se testó la actividad de cada una de las preparaciones de células NK utilizando el exterminio dirigido a rituximab de la línea celular Toledo B.

Para el aislamiento de células T CD4⁺ humanas primarias, sangre entera anticoagulada con heparina, obtenida de donantes sanos a través del Programa de Donantes de Sangre MedImmune, se procesó de acuerdo con el siguiente protocolo: Mezcla de anticuerpos del kit de aislamiento de células T CD4 RosetteSep de Stem Cell Technologies (1 mL, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC Canadá) se añadió por cada 20 mL de sangre entera, se mezcló y se incubó durante 20 minutos (min) a temperatura ambiente (TA). La sangre se diluyó 1:1

con tampón FACS a la temperatura ambiente estéril (PBS, pH 7.2 más suero de ternero recién nacido inactivado por calor al 2%) y se dispuso sobre medio DM-L, seguido de centrifugación durante 20 min. Después de la centrifugación, se separó la capa leucocitaria que contenía células T CD4⁺ humanas, y las células se lavaron una vez con tampón FACS a TA y una vez con medio RPMI completo a TA. Las células se contaron en un contador ViCell para determinar el número de células y la viabilidad, y las células T CD4⁺ se suspendieron en medio RPMI completo a una concentración de 1.0×10^6 por mL.

Células T CD4⁺ humanas primarias (1.0×10^6 por mL en medio RPMI completo) se cultivaron en una incubadora de cultivo de tejidos humidificada a 37°C y 5% de CO₂ durante 48 horas con 2 µg/mL de PHA-L y 20 UI/mL de rhIL-2 para activar células T y supra-regular OX40 y subsiguientemente se utilizaron en ensayos ADCC de OX40mAb24. Todos los donantes en las figuras referenciadas más adelante representan individuos únicos; es decir, las células T CD4⁺ no se aislaron del mismo donante para experimentos ADCC repetidos.

Para discriminar células T diana o células Toledo B cultivadas de células NK humanas purificadas en ensayos de citotoxicidad, el colorante fluorescente DiO se incorporó en la membrana celular de células diana utilizando la disolución de marcaje de células Vybrant DiO (de acuerdo con el protocolo del fabricante para el marcaje de células en suspensión). Después de la activación y el marcaje con DiO de células T CD4⁺ humanas primarias y células Toledo B, células NK efectoras se aislaron de sangre anticoagulada con heparina sódica del Programa de Donantes de Sangre MedImmune

utilizando el mismo protocolo que antes para células T CD4⁺, con la excepción de que se utilizó 1 mL de mezcla de anticuerpos del kit de aislamiento de células NK RosetteSep en lugar de 1 mL de la mezcla de anticuerpos del kit de
5 aislamiento de células T CD4⁺ RosetteSep. Células NK humanas primarias aisladas se lavaron dos veces con medio RPMI completo caliente (RPMI-1640 más FBS al 10%) y luego se suspendieron en RPMI completo a una concentración de 2.67×10^6 por mL. De igual manera, células T CD4⁺ humanas primarias
10 activadas se lavaron también dos veces en RPMI completo caliente y se suspendieron a una concentración de 2.67×10^5 por mL. Después de ello, se añadieron 75 μ L de células NK humanas primarias (200.000) y 75 μ L de células T CD4⁺ humanas primarias activadas (20.000) a pocillos de placas de 96
15 pocillos de fondo redondo tratadas con cultivo no tisular estériles para una relación de efector a diana de 10:1. En algunos experimentos se añadió medio RPMI completo (50 μ L) que contenía OX40mAb24 o mAb control para dar una concentración final de 10 μ g/mL. En otros, se añadió a las
20 células sembradas RPMI completo (50 μ L) que contiene una serie de dilución triple de OX40mAb24 o mAbs control, dando como resultado una concentración final de 67 nM, o una serie de dilución de 27 veces de 9B12 o IgG1 humana R347 partiendo de 67 nM. Rituximab (10 μ g/mL, anticuerpo control) se utilizó
25 como un control positivo en pocillos que contenían células Toledo B que expresan CD20, marcadas con DiO, en lugar de células T CD4⁺ humanas primarias activadas que expresan OX40, dado que las células T CD4⁺ activadas no expresan CD20. Las células en el ensayo ADCC se sedimentaron suavemente mediante
30 centrifugación a TA y subsiguientemente se cultivaron durante 24 horas.

Al término del período de incubación, las células se sedimentaron mediante centrifugación y luego se suspendieron en tampón FACS que contenía 10 µg/mL de yoduro de propidio (PI) para el análisis por citometría de flujo en un citómetro de flujo BD LSRII. Células no viables (PT positivas) entre
5 células T CD4⁺ diana DiO-positivas o células Toledo B se discriminaron utilizando el software FlowJo después de la compensación de la fluorescencia.

La representación gráfica de los datos para ensayos ADCC de células NK, incluyendo la determinación de valores
10 medios y el error típico de la media, se generó utilizando GraphPad Prism versión 5.01 para Windows.

6.2.2 Unión de OX40mAb24 a C1q

Se utilizó un instrumento ProteOn XPR36 para determinar la unión de OX40mAb24 o 9B12 a proteína del complemento humana C1q, purificada a partir de sueros humanos agrupados a OX40mAb24 o 9B12 mediante resonancia de plasmón de superficie. Se utilizó amina estándar para inmovilizar OX40mAb24 o 9B12 en la superficie de un chip biosensor GLC.
15 Se suspendió C1q humana en PBS/Tween 20 al 0.005%, pH 7.4 a cinco concentraciones variables desde 26 nM a 1.6 nM. Se inyectaron las muestras a 30 µL/min durante 200 segundos, y la fase de disociación continuó durante 600 segundos. Se procesaron los datos del sensograma utilizando el software
20 ProteOn Manager 2.1 (Bio-Rad) utilizando un ajuste 1:1.

6.3 Resultados

Se testó la capacidad de OX40mAb24, 9B12 e IgG4P (mAb28) humana y versiones IgG1-TM (mAb29) de OX40mAb24 para mediar en el ADCC a los niveles de saturación (10 µg/mL [67 nM])
30 para la unión de OX40 (véase el Ejemplo 2), utilizando mezclas tanto alogeneicas como autólogas de células NK NK y

células diana que expresan OX40 (Figura 13A y Figura 14A). OX40mAb24 mostró una actividad de ADCC medible frente a células T CD4⁺ humanas activadas. En contraposición, 9B12, mAb28 y mAb29 no mostraron actividad de ADCC por encima de la de los controles negativos. Un anticuerpo control positivo contra CD20 humana (rituximab) demostró actividad de ADCC utilizando las mismas células NK, demostrando que las células NK eran capaces de una robusta actividad de ADCC (Figura 13B y Figura 14B).

En experimentos de dosis-respuesta, OX40mAb24 demostró una actividad de ADCC dependiente de la concentración contra células T CD4⁺ humanas activadas (Figura 15A-D, Figura 16A-D, Figura 17A-B y Tabla 6-2). En contraposición, 9B12 no mostró actividad de ADCC detectable alguna. Además, el mAb control IgG1 humano R347 no mostró actividad de ADCC detectable alguna, lo que confirma que la actividad de ADCC mediada por OX40mAb24 era dependiente del acoplamiento con OX40 en las células diana. Un anticuerpo control positivo contra CD20 humana también demostró una ADCC contra una línea celular de linfoma de células B que expresa CD20 (Figura 13B y Figura 14B); esto sustenta la validez del ensayo. Colectivamente, los resultados de estos experimentos confirmaron que OX40mAb24 es capaz de ADCC contra células diana que han sido cultivadas bajo condiciones que previamente mostraron estimular la expresión de OX40 de la superficie de las células.

**Tabla 6-2 Sumario de la Potencia de ADCC de células NK
mediada por OX40mAb24**

Número de experimento	Número de donante	CE20 (pM)	CE50 (pM)	CE90 (pM)
3	363	134	2380	225000

Número de experimento	Número de donante	CE20 (pM)	CE50 (pM)	CE90 (pM)
3	504	309	1370	14600
4	464	37.0	3050	3330000
4	532	111	1310	66100
5	601	54.4	501	16900
5	602	61.4	527	16000
Media (error típico de la media), pM		118 (41.1)	1520 (415)	611000 (545000)

El potencial de OX40mAb24 de unirse a C1q del componente del complemento humano se evaluó utilizando un ensayo de resonancia de plasmón de superficie. En este ensayo, la unión a C1q se utilizó como un sustituto para la actividad en un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (Dall'Acqua *et al.*, J. Immunol 177:1129-1138 (2006)). 9B12 se utilizó como un anticuerpo control negativo. OX40mAb24 demostró una capacidad, dependiente de la concentración, de unirse a la proteína C1q humana purificada (Figura 18A). En contraposición, 9B12 no demostró unión detectable alguna a la proteína C1q (Figura 18B).

6.4 Conclusiones

OX40mAb24 se une a C1q y desencadena ADCC mediada por NK contra células T CD4⁺ activadas.

EJEMPLO 7: Estudios Comparativos *In Vitro* con OX40mAb24 y Células T de Monos Cynomolgus y Rhesus

En este ejemplo se determinó la capacidad de OX40mAb24 de potenciar la activación de células T utilizando ensayos de bioactividad del informador de dos células con una línea informadora de células T de NFκB-luciferasa de Jurkat que expresa OX40 de monos cynomolgus (cyno)/rhesus. La reticulación del fármaco mediada por el receptor Fcγ fue

mediada por una línea de células B de rhesus o por células que expresan receptor Fcγ en una muestra de sangre entera post-lisis de glóbulos rojos. La activación de OX40 se midió como actividad de luciferasa incrementada en respuesta a la estimulación de la vía de señalización de NFκB aguas abajo de la activación de células T humanas primarias. La señalización de NFκB es un evento aguas abajo, bien estudiado, en la señalización de OX40, y puede correlacionarse con otras medidas de la activación de células T tales como la proliferación y la liberación de citoquinas (Croft M, *et al.*, *Immunol Rev.* 229:173-91 (2009)). Además, se testó la capacidad de OX40mAb24 de potenciar la activación (co-estimulación) mediada por el receptor de células T utilizando un ensayo de bioactividad basado en placa en el que se evaluó la proliferación de células T CD4⁺. Se utilizó un control de isotipo (NIP228 IgG1) para demostrar el acoplamiento a OX40 específico.

En paralelo se midió la bioactividad de 9B12, el anticuerpo monoclonal anti-OX40 murino del que se derivó OX40mAb24, para proporcionar una comparación de la actividad de OX40mAb24 y 9B12 en OX40 de primates no humanos.

7.1 MATERIALES

Materiales utilizados en este estudio se enumeran en la Tabla 7.1.

Tabla 7-1 Materiales

Elemento	Fuente
Cloruro de amonio	StemCell Technologies, Vancouver, BC
Anticuerpo CD3 dirigido contra Ig humana, clon SP34-2	BD Biosciences, San Jose, CA

	Elemento	Fuente
5	Anticuerpo CD4-V450 dirigido contra Ig humana, clon L200	BD Biosciences, San Jose, CA
	Anticuerpo CD28 dirigido contra Ig humana, clon CD28.2	BD Biosciences, San Jose, CA
	Kit de marcado de células CFSE	Life Technologies, Carlsbad, CA
	Concanavalina A	Sigma, Saint Louis, MO
10	Lector de placas Multilabel EnVision	Perkin Elmer, Waltham, MA
	Anticuerpo Fcγ anti-humano de cabra	Jackson Immunoresearch, West Grove, PA
	Anticuerpo Fcγ anti-ratón de cabra	Jackson Immunoresearch, West Grove, PA
15	Suero de feto bovino inactivado por calor (FBS)	Life Technologies, Carlsbad, CA
	Interleuquina-2, humana recombinante	Preprotech, Rocky Hill, NJ
	Citómetro de flujo LSR II	BD Biosciences, San Jose, CA
20	Medio de separación de leucocitos (LSM)	MP Biomedicals, Santa Ana, CA
	Tampón MACS	Miltenyi, San Diego, CA
	Kit de aislamiento de células T CD4 de primates no humanos	Miltenyi, San Diego, CA
25	Yoduro de propidio (1 mg/ml de solución)	Sigma, Saint Louis, MO
	Sangre completa anticoagulada con heparina sodio obtenida de mono rhesus de origen indio	Worldwide Primates, Miami, FL
30		

	Elemento	Fuente
	Medio RPMI-1640	Life Technologies, Carlsbad, CA
5	Disolución de Ensayo de Luciferasa SteadyGlo	Promega, Madison, WI
	Contador ViCell	Beckman Coulter, Indianapolis, IN

7.2 Ensayos

7.2.1 Ensayos de Bioactividad de 2 Células de 10 Cyno/Rhesus

OX40mAb24 se sometió a ensayo en cuanto a la bioactividad utilizando un ensayo informador de 2 células. Dado que los monos cyno y rhesus comparten secuencias de aminoácidos de OX40 idénticas, se utilizó una línea de
15 células informadoras de NFκB-luciferasa de Jurkat (clon B2) que expresa OX40 para la lectura del agonismo de OX40 (actividad de NFκB). Para mediar en la reticulación de OX40mAb24 y, por consiguiente, en la agrupación de células informadoras Jurkat de OX210, se utilizó una línea de células
20 B de rhesus que expresa el receptor Fcγ, LCL8664, o leucocitos de la sangre entera de un mono rhesus normal, que contiene células que expresan FcγR. La bioactividad del fondo se evaluó tanto sin la adición de OX40mAb24 como
25 también en ausencia de las células que expresan FcγR. Para demostrar el papel del acoplamiento de OX40 a células informadoras, se utilizó un control de isotipo en lugar de OX40mAb24.

El ensayo de bioactividad de 2 células de OX40mAb24 con
30 LCL8664 se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo:

El día antes del uso el clon B2 informador de NFκB-luciferasa de Jurkat que expresa OX40 de cyno/rhesus y

LCL8664 se cultivaron en medio RPMI completo (RPMI con suero bovino fetal [FBS] al 10% y 1% de antibióticos/antimicóticos) para conseguir densidades celulares de aproximadamente 5×10^6 células/mL y 4×10^5 células/mL, respectivamente. Al día siguiente, células informadoras Jurkat de OX40 y LCL8664 se sedimentaron, suspendieron en medio completo y contaron utilizando un contador ViCell antes de ajustar las concentraciones celulares para ambas líneas celulares a 2.5×10^6 en medio completo.

Clon B2 y células LCL8664 se añadieron en cada caso a una placa tratada con cultivo no tisular, de fondo redondo y de 96 pocillos a razón de 100.000 células por pocillo. OX40mAb24 se añadió a las células en medio RPMI completo hasta una concentración final que comenzaba a 30 µg/mL y se diluyó en incrementos triples. De manera similar, IgG1 R347 (control del isotipo) se utilizó a una concentración final de 10 µg/mL y se diluyó en incrementos de 6 veces. 9B12 y MOPC-21 (control del isotipo) se diluyeron de la misma manera. Las placas se transfirieron a una incubadora a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ humidificada.

Después de un tiempo de incubación de 16 horas, se añadieron a cada uno de los pocillos 100 µL de disolución de ensayo de luciferasa Steady-Glo reconstituida y se mezclaron para lisar las células y luego se incubaron para equilibrar la señal de luciferasa. El lisado Steady-Glo/muestra (150 µL) se transfirió de cada uno de los pocillos a una placa de ensayo de paredes blancas, de 96 pocillos, para la detección y la lectura de luminiscencia utilizando un lector de luminiscencia Envision de Perkin Elmer.

Se utilizó el siguiente protocolo para adquirir células rhesus lisadas con RBC a partir de sangre entera anti-coagulada con heparina sódica, obtenida de un macaco rhesus de origen indio sano:

5 Sangre entera reciente (5 mL) se añadió a un tubo cónico de 50 mL y se añadieron 45 mL de disolución de cloruro de amonio. La mezcla de células se incubó durante 10 minutos en hielo, luego se sedimentó y se lavó con medio RPMI completo, tras lo cual las células estaban listas para uso en el ensayo
10 de bioactividad de 2 células.

El ensayo de bioactividad de 2 células con células de sangre entera lisadas con RBC de rhesus se realizó tal como se describe con la línea de células B de rhesus LCL8664, pero se utilizaron 10 µg/mL de NIP228 IgG1 como el anticuerpo
15 control negativo.

7.2.2 Ensayo de Proliferación de células T CD4 de Rhesus

La bioactividad de OX40mAb24 se determinó en un ensayo de proliferación de células T CD4⁺ utilizando células T CD4⁺
20 de rhesus primarias activadas y fármaco capturado en placa de acuerdo con el siguiente protocolo. Células T CD4⁺ de rhesus se aislaron de sangre entera anti-coagulada con heparina sódica obtenida de monos rhesus sanos (N = 2) de World Wide Primates como la fuente de células respondedoras.

25 Sangre de rhesus heparinizada reciente se diluyó 1:1 con PBS a la temperatura ambiente (TA). Después, 20 mL de sangre entera diluida se dispusieron sobre 15 mL de medio de separación de linfocitos (LSM) al 95% en un tubo de centrífuga cónico de 50 mL. La sangre se centrifugó a 400
30 x g durante 30 minutos a la temperatura ambiente sin reposo. Células mononucleares de la sangre periférica se recogieron

en la interfaz y se lavaron dos veces con tampón MACS de Miltenyi y se sedimentaron. El sedimento de células se trató con tampón de lisis de glóbulos rojos durante 5 minutos, y el tampón de lisis se desactivó con la adición de medio RPMI
5 completo. Las células se lavaron y suspendieron en tampón MACS y se contaron con un contador ViCell para determinar el número de células y la viabilidad.

Células T CD4⁺ de rhesus se aislaron con un kit de primates no humanos de Miltenyi de acuerdo con las
10 instrucciones del fabricante. Después, las células T CD4⁺ se contaron en un contador ViCell, se suspendieron a razón de 1×10^6 células/ mL en medio RPMI completo con 51 µg/mL de Concanavalina A y 1000 UI/mL de IL-2 y se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂ en una incubadora humidificada durante 2 días
15 para activar las células T e inducir la expresión de OX40. Placas de ensayo de 96 pocillos, de fondo redondo y tratadas con cultivo no tisular se recubrieron con 100 µL de 2 µg/mL de IgG Fcγ-específica anti-ratón de cabra y 2 µg/mL de IgG Fcγ-específica anti-humana de cabra en PBS. Anticuerpos de
20 captura de IgG anti-humana de cabra no se añadieron a los pocillos destinados para el ensayo de la actividad de OX40mAb24 soluble. Las placas se incubaron durante la noche a 4°C, se lavaron con 200 µL de PBS, y se bloquearon durante 90 minutos a 37°C con BSA al 1% en PBS (BSA al 1%/PBS). Las
25 placas se lavaron con PBS y se añadieron 2 ng/mL de (clon SP34-2) anti-CD3 reconstituido en BSA al 1%/PBS a las placas durante 90 minutos a 37°C. Las placas se lavaron con PBS para separar OX40mAb24 no unido, mAb control de IgG1 humano R347, 9B12 y mAb control de IgG1 de ratón (clon MOPC-21) se
30 reconstituyeron en cada caso en BSA al 1%/PBS, partiendo de 1.01 µg/mL (6.67 nM; experimento 1) o 1.5 µg/mL (10.0 nM;

experimento 2) y se diluyeron en serie a lo largo de una serie de dilución triple y luego se añadieron a placas de ensayo e incubaron durante 90 minutos a 37°C.

Células T CD4⁺ humanas primarias activadas se
5 recogieron, lavaron en medio RPMI completo y la concentración se ajustó a 1.0×10^6 células viables/mL. Las células se marcaron con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con la excepción de utilizar CFSE 1.25 µM en lugar del 5 µM
10 recomendado, con una incubación de 10 minutos a 37°C. Después del marcaje, las células se suspendieron en RPMI completo y la concentración se ajustó a 1.0×10^6 por mL. Las placas se lavaron con PBS y 200 µL de células T CD4⁺ (200.000/pocillo) se añadieron a cada uno de los pocillos. Después, la placa
15 se incubó a 37°C durante 3 días.

Después de un tiempo de incubación de 72 horas, las células T CD4⁺ se sedimentaron y se lavaron una vez con PBS que contenía FBS al 2% (tampón FACS). Las células se suspendieron en mezcla de unión que contenía anticuerpo
20 marcado con V450®anti-CD4 para la identificación de células T CD4⁺ y yoduro de propidio (PI) para la discriminación de células vivas/no viables, y se incubaron durante 30 minutos. Después de la incubación, las células se lavaron en tampón FACS, se re-suspendieron en tampón FACS y se analizaron
25 mediante citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo LSRII y software FlowJo para el análisis de los datos formateados por citometría de flujo estándar (FCS).

El ensayo se repitió en dos experimentos independientes utilizando células T CD4⁺ de rhesus primarias.

30 Para evaluar la proliferación de células T, se sincronizaron eventos vivos (yoduro de propidio- negativos)

utilizando el software FlowJo, y se determinó el porcentaje de células sincronizadas con CD4⁺ que muestra la dilución de CFSE. La actividad específica de OX40mAb24 se calculó sustrayendo el porcentaje de células sincronizadas CD4⁺ que muestra la dilución de CFSE en respuesta a anti-CD3 sólo del porcentaje de células sincronizadas CD4⁺ que muestra la dilución de CSFE en respuesta al anticuerpo anti-CD3 más OX40mAb24.

Las concentraciones de OX40mAb24 que consiguieron respuestas semi-máximas (CE₅₀) en el ensayo informador de NFκB de Jurkat y el ensayo de células T CD4⁺ de rhesus primario se determinaron utilizando el análisis de regresión no lineal (log dosis-respuesta, curvas de fijación de 4 parámetros) en GraphPad Prism, versión 5.01 (San Diego, CA).

7.3 RESULTADOS

7.3.1 Ensayos de Bioactividad de 2 Células de Cyno/Rhesus

Resultados de los ensayos de bioactividad de 2 células cyno/rhesus se muestran en la Tabla 7-2, Figura 19A-B, Figura 20A-B y Figura 21A-B. OX40mAb24 activó la vía de señalización de OX40, tal como se mide por la señalización de NFκB, en células T de Jurkat que expresan OX40 de cyno/rhesus en presencia de la línea de células B de rhesus, LCL8664, con una CE₅₀ media de 1450 pM (N = 2 experimentos). Tal como se muestra en la Tabla 7-2, el valor de CE₅₀ de la actividad de OX40mAb24 en el ensayo de 2 células de cyno/rhesus era 1.3 veces superior que en ensayos de 2 células humanas con la línea de células Raji B, mientras que 9B12 tenía una actividad limitada en ensayos de 2 células de cyno/rhesus y no se pudo determinar el valor de CE₅₀.

Además, tal como se muestra en la Tabla 7-2, OX40mAb24 activó la vía de señalización de OX40 en células T de Jurkat en presencia de sangre entera lisada con RBC de rhesus, que se espera que contenga células que expresan receptor Fcγ, con una CE₅₀ de 550 pM (M = 1 experimento). Tal como muestra también la Tabla 7-2, el valor de CE₅₀ de 9B12 en el mismo ensayo era 6052 pM, y era 4680 pM en un ensayo de 2 células humanas con la línea de células Raji B.

Tabla 7-2 Concentración Eficaz Semi-Máxima Media para OX40mAb24 y 9B12 en Ensayos de Bioactividad de 2 células

	Formato de ensayo de 2 células		
	Bioactividad de células B LCL8664 de rhesus + del clon B2 de NFκB-luciferasa de Jurkat que expresa OX40 de cyno/rhesus [CE ₅₀ media (ErrTíp); n]	Bioactividad de sangre entera lisada con RBC de rhesus + del clon B2 de NFκB-luciferasa de Jurkat que expresa OX40 de cyno/rhesus [CE ₅₀ media (ErrTíp); n]	Bioactividad ^a de células Raji B humanas + clon 64 de NFκB-luciferasa de Jurkat 040 humano [CE ₅₀ media (ErrTíp); n]
Artículo de Ensayo o Control			
OX40mAb24	1450 (204); n=2	550; n=1	1110 (92.5); n=5
IgG1 humana R347	sin actividad; n=2	SE	sin actividad
IgG1	SE	sin	SE

	Formato de ensayo de 2 células		
	Bioactividad de células B LCL8664 de rhesus + del clon B2 de NF κ B-luciferasa de Jurkat que expresa OX40 de cyno/rhesus [CE ₅₀ media (ErrTíp); n]	Bioactividad de sangre entera lisada con RBC de rhesus + del clon B2 de NF κ B-luciferasa de Jurkat que expresa OX40 de cyno/rhesus [CE ₅₀ media (ErrTíp); n]	Bioactividad ^a de células Raji B humanas + clon 64 de NF κ B-luciferasa de Jurkat 040 humano [CE ₅₀ media (ErrTíp); n]
Artículo de Ensayo o Control			
humana NIP228		actividad; n=1	
9B12	ND	6052; n=1	4680 (1220); n = 5

ErrTíp = error típico de la media. n = número de experimentos. NT = No testado ND = No determinado

^a Datos del Ejemplo 5.

7.3.2 Ensayo de Proliferación de células C Primarias de Rhesus

En la Tabla 7-3, Tabla 7-4 y Figura 22A-D se muestran los resultados del ensayo de proliferación de células T primarias de rhesus. OX40mAb24 inducía la proliferación de células T CD4⁺ de rhesus primarias con una CE₅₀ media de 436 pM (Tabla 7-3; N = 2 experimentos). Tal como se muestra en la Tabla 7-5, el valor de CE₅₀ para 9B12 era 110 pM (Tabla 7-4; N = 2 experimentos). OX40mAb24 inducía la proliferación

de células T CD4⁺ humanas primarias activadas en un formato de ensayo similar con una CE₅₀ media de 28 pM (Tabla 7-5; datos del Ejemplo 4).

**Tabla 7-3 Concentración Eficaz Semi-Máxima Media para
OX40mAb24 en Ensayos de Proliferación de células T CD4 de
Rhesus Primarias**

Anticuerpo de ensayo o control	Nº de Experimentos	CE ₅₀ media (ErrTíp)
OX40mAb24	2	436 (309)
NIP228 IgG1	2	Sin actividad

ErrTíp = error típico de la media.

**Tabla 7-4 Concentración Eficaz Semi-Máxima Media para 9B12
en Ensayos de Proliferación de células T CD4 de Rhesus
Primarias**

Anticuerpo de ensayo o control	Nº de Experimentos	CE ₅₀ media (ErrTíp)
9B12	2	110 (13)
IgG1 de ratón MOPC-21	2	Sin actividad

ErrTíp = error típico de la media.

**Tabla 7-5 Concentración Eficaz Semi-Máxima Media para
OX40mAb24 y 9B12 en Ensayos de Proliferación de células T
CD4 de Rhesus y Humanas**

Anticuerpo de ensayo o control	Rhesus Media (ErrTíp)	Humano Media (ErrTíp)
OX40mAb24	436 (309)	28 (98)
9B12	110 (13)	218 (35)

ErrTíp = error típico de la media.

7.4 CONCLUSIONES

OX40mAb24 activaba la vía de señalización de OX40 en una línea de células informadoras NFκB de células T de Jurkat

que expresan OX40 de cyno/rhesus en presencia de células B de rhesus o células que expresan el receptor Fc γ contenidas en la sangre entera de rhesus lisada con RBC. Además, OX40mAb24 inducía la proliferación de células T CD4⁺ de rhesus primarias.

EJEMPLO 8: Actividad de OX40mAb24 en Modelos de Ratón de Cánceres Humanos

Este ejemplo se diseñó para determinar si OX40mAb24 es eficaz como una terapia de agente único para el tratamiento de cánceres. Este estudio se realizó en modelos de xenoinjerto de cánceres humanos mezclados con células T humanas alorreactivas en ratones diabéticos no obesos inmunocomprometidos/inmunodeficientes combinados graves (NOD/SCID).

8.1 Materiales

Los materiales utilizados en este estudio, y su fuente, se relacionan en la Tabla 8-1.

Tabla 8-1 Materiales

Elemento	Fuente
Medio DMEM	Invitrogen, Carlsbad, CA
FBS	Invitrogen, Carlsbad, CA
Medio de separación de linfocitos	VWR, West Chester, PA
PBS	Invitrogen, Carlsbad, CA
RPMI 1640	Invitrogen, Carlsbad, CA
Kit de enriquecimiento en células T CD4 ⁺ RosetteSep	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC Canadá
Kit de enriquecimiento en células T CD8 ⁺ RosetteSep	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC Canadá
Medio DML RosetteSep	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC Canadá

Elemento	Fuente
Mitomicina C	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

8.2 Protocolos Experimentales

5 8.2.1 Animales de Ensayo

Ratones NOD/SCID hembras de 5 a 9 semanas de edad se obtuvieron de Harlan Laboratories, Inc. Los animales fueron tratados humanitariamente y alojados de acuerdo con protocolos aprobados por el Comité para el Cuidado y Uso de
10 Animales Institucional en las instalaciones de Fuentes de Animales de Laboratorio en MedImmune, una Asociación para la Acreditación de Animales de Cuidado de Animales de Laboratorio en las Instalaciones licenciadas por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos. Los animales
15 se mantuvieron en unidades de microaislamiento estériles, provistos de cama y alimento, y agua de bebida acidificada a voluntad. Las condiciones ambientales fueron las normalizadas (temperatura ambiente: 20°C +/- 1°C; humedad relativa: 50% $\pm$ 10%; ciclo de 12 horas de luz-oscuridad).
20 Los animales se controlaron diariamente para evidenciar signos clínicos adversos y semanalmente para el peso corporal.

8.2.2 Establecimiento de Xenoinjertos

Células A375 cancerosas humanas procedentes de una
25 línea celular de melanoma humano se obtuvieron de ATCC. Las células se hicieron crecer en DMEM con FCS al 10% a 37°C bajo 5% de CO₂ en una incubadora humidificada. Luego se recolectaron, se lavaron una vez con PBS y luego se resuspendieron en PBS.

30 Células A375 cancerosas humanas se recolectaron de cultivos celulares. Se resuspendieron en PBS. Células A375

se mezclaron subsiguientemente con líneas de células T CD4⁺ y CD8⁺ alorreactivas a líneas de células tumorales A375 antes de la implantación en los animales.

Para generar las líneas celulares de células T CD4⁺ y CD8⁺ T, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) procedentes de donantes sanos se enriquecieron en células T CD4⁺ o CD8⁺ T mediante la adición de 1 ml de producto de enriquecimiento de células T RosetteSep por cada 20 ml de hemoproducto. Esto fue seguido por una incubación de 20 minutos, y el posterior aislamiento mediante centrifugación por gradiente de gravedad usando medio de densidad RosetteSep DM-L. Después de la centrifugación, las células se lavaron 3 veces con PBS complementado con suero de bovino fetal (FBS) al 2% y se resuspendieron en medio RPMI 1640 complementado con FBS al 10%. Células T CD4⁺ y CD8⁺ enriquecidas se cultivaron por separado durante 7 a 10 días en medio complementado con interleuquina 2 humana recombinante (rhIL-2) y cada una se combinó con células A375 tratadas con mitomicina C. Las células T se recogieron y se cultivaron por separado durante 7 a 10 días en medio complementado con rhIL-2 y se combinaron con células A375 tratadas con mitomicina C. Las células T CD4⁺ y CD8⁺ se recogieron y se combinaron en una relación 2:1.

Células A375 y PMBCs enriquecidos para células T CD4⁺ y CD8⁺ se mezclaron en una relación de 6 células A375 a 1 célula T inmediatamente antes de la implantación.

Se establecieron xenoinjertos mediante inyección subcutánea (SC) de 3.5×10^6 células (células T humanas mezcladas con células A375 a una relación de efector a diana (E:T) de 1:6 y se suspendieron en 200 µL de PBS) en los flancos derechos de los animales.

8.2.3 Aleatorización, Designación de Grupos y Niveles de Dosis

Se asignaron aleatoriamente seis animales a cada grupo experimental antes de la inyección SC de las células. No
5 hubo sustituciones de animales. Las designaciones de grupos y los niveles de dosis para cada uno de los experimentos se enumeran en la Tabla 8-2, Tabla 8-3 y Tabla 8-4. Anticuerpos de ensayo y control se diluyeron en PBS a concentraciones apropiadas y se administraron por vía intraperitoneal (IP)
10 en un volumen total de 200 µL. La primera dosis de los anticuerpos de ensayo y control se administró el Día 3 ó 4 después de la implantación de células T cancerosas/efectoras. Los animales recibieron hasta 3 dosis adicionales de los anticuerpos de ensayo y control, tal como
15 se indica en las figuras y se describe en la correspondiente descripción de las figuras. La formación de tumores se observó en cada uno de los animales 1 ó 2 veces por semana. Los puntos extremos primarios en este estudio era un volumen de tumor de 2000 mm³ o necrosis del tumor macroscópico.

20 8.2.4 Mediciones de los Tumores

Los tumores se midieron a los intervalos indicados en las figuras y las tablas para cada uno de los experimentos mediante calibre y los volúmenes (V) de los tumores se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

$$25 \quad V \text{ (mm}^3\text{)} = (\text{longitud [mm]} \times \text{anchura [mm]} \times \text{anchura [mm]})/2.$$

Para cada grupo, los resultados se notifican como la media aritmética. Los efectos antitumorales se expresaron como porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor (%
30 TGI), que se calculó como sigue:

% TGI = (1 - [V medio del tumor del grupo de tratamiento] ÷ [V medio del tumor del grupo control]) x 100

8.3 Métodos estadísticos

Se realizó una comparación entre los animales tratados con OX40mAb24 o tratados con 9B12 y los animales tratados con control del isotipo, y se analizaron las diferencias entre grupos en cuanto a la significancia estadística mediante un test de suma de rangos de Mann-Whitney.

Los valores significativos obtenidos de la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney se presentan en las tablas resumen y figuras adyacentes a la media aritmética y desviación estándar de la media.

8.4 Resultados

La actividad de OX40mAb24 sobre el crecimiento de tumores en modelos de ratones de cáncer humano se investigó en este estudio. A animales hembras NOD/SCID inmunodeficientes se les implantaron líneas celulares de cáncer humano mezcladas con líneas de células T CD4⁺ y CD8⁺ humanas alorreactivas. Las células T CD4⁺ y CD8⁺ T se derivaron de PBMC aisladas de donantes humanos sanos. Los animales recibieron la primera dosis de los anticuerpos de ensayo y control tres o cuatro días después de la implantación de xenoinjertos y se les administraron dosis adicionales de los anticuerpos de ensayo y control tal como se indica.

En tres experimentos separados, OX40mAb24 más células T humanas alorreactivas inhibieron significativamente el crecimiento de células A375 en hasta un 85% en comparación con el grupo control del isotipo (Tabla 8-2, Tabla 8-3, y Tabla 8-4; Figura 23A, Figura 24A y Figura 25). 9B12 de control más células T humanas alorreactivas inhibieron

también significativamente el crecimiento de células A375 en hasta un 77% en comparación con el grupo control del isotipo (Tablas 8-2 a 8-4, Figura 23B y Figura 24B).

Tabla 8-2 Grupos de Tratamiento y Porcentaje de TGI en Modelo de Xenoinjertos A375 el Día 18 (Experimento 2)

Grupo ^a	Anticuerpo de Ensayo	Dosis ^b (mg/kg)	% TGI ^c
1	Ninguno; sin linfocitos T	NA	NA
2	Ninguno	NA	NA
3	Isotipo del control	5	NA
4	OX40mAb24	5	79
5	OX40mAb24	2.5	75
6	OX40mAb24	1.0	85
7	9B12	5	53

IP = intraperitoneal; NA = no aplicable; TGI = inhibición del crecimiento del tumor; V = volumen

^a Número de animales por grupo: 6.

^b Todos los animales recibieron 200 µl de anticuerpo de ensayo IP los Días 4, 7, 9 y 12

^c % TGI = $[1 - (V \text{ medio del tumor } V \text{ del grupo de tratamiento}) \div (V \text{ medio del tumor del grupo de control del isotipo})] \times 100$

Tabla 8-3 Grupos de Tratamiento y Porcentaje de TGI en Modelo de Xenoinjertos A375 el Día 25 (Experimento 1)

Grupo ^a	Anticuerpo de Ensayo	Dosis ^b (mg/kg)	% TGI ^c
1	Ninguno; sin linfocitos T	NA	NA
2	Ninguno	NA	NA
3	Isotipo del control	5	NA
4	OX40mAb24	5	68
5	OX40mAb24	2.5	83
6	OX40mAb24	1.0	84
7	9B12	5	80

IP = intraperitoneal; NA = no aplicable; TGI = inhibición del crecimiento del tumor; V = volumen

^a Número de animales por grupo: 6.

^b Todos los animales recibieron 200 µl de anticuerpo de ensayo IP los Días 4, 7, 9 y 12

^c % TGI = $[1 - (V \text{ medio del tumor } V \text{ del grupo de tratamiento}) \div (V \text{ medio del tumor del grupo de control del isotipo})] \times 100$

Tabla 8-4 Grupos de Tratamiento y Porcentaje de TGI en Modelo de Xenoinjertos A375 el Día 28 (Experimento 3)

Grupo ^a	Anticuerpo de Ensayo	Dosis ^b (mg/kg)	% TGI ^c
1	Ninguno; sin linfocitos T	NA	NA
2	Ninguno	NA	NA
3	Isotipo del control	3.0	NA
4	OX40mAb24	3.0	75
5	OX40mAb24	1.0	73
6	OX40mAb24	0.3	68

Grupo ^a	Anticuerpo de Ensayo	Dosis ^b (mg/kg)	% TGI ^c
7	OX40mAb24	0.1	84
8	OX40mAb24	0.03	73

5 IP = intraperitoneal; NA = no aplicable; TGI = inhibición del crecimiento del tumor; V = volumen

^a n = 6.

^b Todos los animales recibieron 200 µl de anticuerpo de ensayo IP los Días 3, 6, 8 y 10

10 ^c % TGI = $[1 - (V \text{ medio del tumor } V \text{ del grupo de tratamiento}) \div (V \text{ medio del tumor del grupo de control del isotipo})] \times 100$

8.5 Conclusiones

15 OX40mAb24 demostró una potente actividad antitumoral en modelos de ratones de cáncer humano mezclado con células T humanas alorreactivas. La actividad antitumoral de OX40mAb24 era similar a la actividad antitumoral de 9B12. Estos resultados proporcionan evidencia de que OX40mAb24 puede ser eficaz como una terapia de agente único para el tratamiento de pacientes con cáncer con un infiltrado de células T.

20 EJEMPLO 9: Anticuerpo Quimera IgG2a OX40 Anti-Ratón de Rata/Ratón Clon OX86 Inhibe el Crecimiento de Líneas de Células Cancerosas de Ratón en Modelos Singeneicos

25 OX40mAb24 no reacciona de forma cruzada con (m)OX40 de ratón (Véase el Ejemplo 2); por lo tanto, no es posible testar su actividad en modelos de ratón inmunocompetentes. OX86 es un anticuerpo IgG1 anti-mOX40 de rata que se une específicamente a y desencadena la señalización de mOX40 (al-Shamkhani *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 26:1695-1699 (1996)),
30 y tiene actividad anti-tumoral en modelos de ratón inmunocompetentes de cáncer (Weinberg AD, *et al.*, J.

Immunol. 164:2160-2169 (2000)). Para estudiar más fondo los efectos del agonismo de OX40, utilizando un anticuerpo sustituto de ratón con propiedades similares a OX40mAb24, se generó a partir de OX86 un anticuerpo quimera IgG2a anti-mOX40 de rata/ratón (OX86 mIgG2a; regiones variables de cadena ligera y pesada anti-OX40 de rata con regiones constantes de IgG2a de ratón). Este ejemplo evalúa la actividad anti-tumoral como agente único de mIgG2a OX86 en tres modelos de cáncer de ratón.

9.1 Materiales

Los materiales utilizados en este estudio, y su fuente, se relacionan en la Tabla 9-1.

Tabla 9-1 Materiales

Elemento	Fuente
Solución salina tamponada con fosfato, pH 7.2	Life Technologies, Carlsbad, CA
Suero de feto de ternera, activado térmicamente (FBS)	Life Technologies, Carlsbad, CA
Medio de Roswell Park Memorial Institute 1640	Life Technologies, Carlsbad, CA
Tripsina-EDTA al 0.25% (1x)	Life Technologies, Carlsbad, CA

EDTA = ácido etilendiaminatetraacético.

9.2 Protocolos Experimentales

9.2.1 Animales de Ensayo

Ratones BALB/c y C57BL/6 de 6-8 semanas de edad se recibieron en MedImmune de Harlan Laboratories, Inc. (Indianapolis, IN) y se dejó que se aclimataran durante 3 días antes del comienzo del estudio. Después de ello, los ratones fueron rasurados en los sitios de implantación del

tumor y se les implantaron transpondedores de microchip para la identificación.

Los animales fueron alojados de acuerdo con protocolos aprobados por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales Institucional en las instalaciones de Fuentes de Animales de Laboratorio en MedImmune, una Asociación para la Acreditación de Animales de Cuidado de Animales de Laboratorio en las Instalaciones licenciadas por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos. Los animales se mantuvieron en unidades de microaislamiento estériles, provistos de cama y alimento, y agua de bebida acidificada a voluntad. Las condiciones ambientales fueron las normalizadas (temperatura ambiente: $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; humedad relativa: $50\% \pm 10\%$; ciclo de luz-oscuridad 12 horas) Los animales fueron vigilados diariamente en cuanto a signos clínicos adversos y bi-semanalmente en cuanto al peso corporal. En caso de parálisis de las extremidad posteriores, estrés respiratorio, pérdida del 20% de peso corporal, o volumen tumoral mayor de 2000 mm^3 , los animales se sacrificaron inmediatamente de forma humana por asfixia con CO_2 .

9.2.2 Establecimiento e Implantación de Tumores Singeneicos

CT26 y 4T1 se obtuvieron de ATCC en Manassas, VA. Células MCA205 se obtuvieron de Providence Cáncer Center, Portland, OR. Todas las células se cultivaron en medio de cultivo de células RPMI 1640 complementado con FBS al 10% y se cultivaron a 37°C a 5% de CO_2 en una cámara de cultivo tisular humidificada, después se recogieron, se lavaron una vez en FBS y luego se resuspendieron en PBS.

Se establecieron aloinjertos mediante inyección subcutánea (SC) de 5.0×10^5 células CT26, o 1.0×10^5 células 4T1 suspendidas en 0.1 mL de PBS en el flanco derecho de ratones BLAB/c de 7 a 9 semanas de edad, al tiempo que 2.5×10^5 células MCA205 suspendidas en 0.1 mL de solución salina tamponada con fosfato se inyectaron en el flanco derecho de ratones C57BL/6 de 7 a 9 semanas de edad.

9.2.3 Aleatorización, Designación de Grupos y Niveles de Dosis

Se utilizaron ratones hembras BALB/c (total de 216) y C57BL/6 (total de 70) en este estudio. Ratones BALB/c a los que se implantaron células tumorales CT26 se asignaron aleatoriamente después de que los tumores crecieran hasta un volumen medio de 120 mm^3 por cohorte, 9 días después de la implantación o 200 mm^3 por cohorte, 13 días después de la implantación. Ratones BALB/c a los que se implantaron células tumorales 4T1 se asignaron aleatoriamente después de que los tumores crecieran hasta un volumen medio de 120 mm^3 por cohorte, 13 días después de la implantación. Ratones C57BL/6 se asignaron aleatoriamente después de que los tumores crecieran hasta un volumen medio de 95 mm^3 por cohorte, 11 días después de la implantación. Las designaciones de grupos, el número de animales y el programa de dosis se presentan en la Tabla 9-2, Tabla 9-3, Tabla 9-4 y Tabla 9-5. Todos los anticuerpos de ensayo y de control fueron administrados por inyección intraperitoneal (IP). No hubo sustituciones de animales.

Animales de cada uno de los grupos fueron sacrificados cuando los volúmenes de los tumores alcanzaron aproximadamente 2000 mm^3 o cuando los tumores se volvieron ulcerados o necróticos.

Tabla 9-2 Diseño del Estudio: Modelo Singeneico de CT26

Grupo	Número de animales (M/F)	Tratamiento	Programa de la dosis (día del estudio)	Nivel de dosis (mg/kg) ^a	ROA
1	10 (F)	Ninguno	NA	NA	IP
2	10 (F)	Control negativo (OX86 mIgG1 D265A)	9, 12	2.5	IP
3	10 (F)	OX86 mIgG2a	9, 12	2.5	IP
4	10 (F)	OX86 mIgG2a	9, 12	1.0	IP
5	10 (F)	OX86 mIgG2a	9, 12	0.25	IP
6	10 (F)	OX86 mIgG2a	9, 12	0.1	IP

F = hembra; IgG1 = inmunoglobulina G1; IP = intraperitoneal; mAb = anticuerpo monoclonal; OX86 mIgG2a = regiones variables de cadena ligera y cadena pesada anti-OX40 de rata del clon OX86 con regiones constantes de IgG2a de ratón; OX86 mIgG1 D265A = mIgG1 OX40 anti-ratón de ratón con una mutación puntual en el dominio Fc que reduce su capacidad de unirse a receptores Fcγ; NA = no aplicable debido a que los animales no fueron tratados; ROA = vía de administración. ^a Volumen de la dosis: 0.2 mL

Tabla 9-3 Diseño del Estudio: Modelo Singeneico de CT26

Grupo	Número de animales (M/F)	Tratamiento	Programa de la dosis (día del estudio)	Nivel de dosis (mg/kg) ^a	ROA
1	12 (F)	Ninguno	NA	NA	IP

5

10

Grupo	Número de animales (M/F)	Tratamiento	Programa de la dosis (día del estudio)	Nivel de dosis (mg/kg) ^a	ROA
2	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16	10	IP
3	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16	3	IP
4	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16	1	IP
5	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16	0.3	IP
6	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16	0.1	IP

15

F = hembra; IP = intraperitoneal; OX86 mIgG2a = regiones variables de cadena ligera y cadena pesada anti-OX40 de rata del clon OX86 con regiones constantes de IgG2a de ratón; NA = no aplicable debido a que los animales no fueron tratados; ROA = vía de administración. ^a Volumen de la dosis: 0.2 mL

Tabla 9-4 Diseño del Estudio: Modelo Singeneico de MCA205

20

25

Grupo	Número de animales (M/F)	Tratamiento	Calendario de la dosis (día del estudio)	Nivel de dosis (mg/kg) ^a	ROA
1	14 (F)	Ninguno	NA	NA	IP
2	14 (F)	Isotipo del control (mezcla) ^b	11, 14	20	IP
3	14 (F)	OX86 mIgG2a	11, 14	10	IP
4	14 (F)	OX86 mIgG2a	11, 14	10	IP
5	14 (F)	OX86 mIgG2a	11, 14	5	IP

30

F = hembra; IP = intraperitoneal; OX86 mIgG2a = regiones variables de cadena ligera y cadena pesada anti-OX40 de rata del clon OX86 con regiones constantes de IgG2a de ratón; NA

= no aplicable debido a que los animales no fueron tratados;
ROA = vía de administración. ^a Volumen de la dosis: 0.2 mL.

^b Mezcla contiene anticuerpos control del isotipo con dominios Fc de mIgG2a (10 mg/kg) y mIgG2b (10 mg/kg).

5 **Tabla 9-5 Diseño del Estudio: Modelo Singeneico de 4T1**

Grupo	Número de animales (M/F)	Tratamiento	Programa de la dosis (día del estudio)	Nivel de dosis (mg/kg) ^a	ROA
1	12 (F)	Ninguno	NA	NA	IP
2	12 (F)	Isotipo del control (mezcla) ^b	13, 16, 20, 23	70	IP
3	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16, 20, 23	10	IP
4	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16, 20, 23	5	IP
5	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16, 20, 23	2.5	IP
6	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16, 20, 23	1.0	IP
7	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16, 20, 23	0.25	IP

F = hembra; IP = intraperitoneal; OX86 mIgG2a = regiones variables de cadena ligera y cadena pesada anti-OX40 de rata del clon OX86 con regiones constantes de IgG2a de ratón; NA = no aplicable debido a que los animales no fueron tratados; ROA = vía de administración. ^a Volumen de la dosis: 0.2 mL.

^b Mezcla contiene anticuerpos control del isotipo con

dominios Fc de mIgG2a (10 mg/kg), mIgG2b (20 mg/kg), IgG2a de rata (20 mg/kg) e IgG2b de rata (20 mg/kg).

9.2.4 Mediciones de los Tumores

Los tumores se midieron mediante calibrado dos veces
5 por semana y los volúmenes de los tumores se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen (V) del tumor} = [\text{longitud (mm)} \times \text{anchura (mm)}^2] / 2$$

en donde la longitud se definió como el lado más largo
10 y la anchura como el lado más pequeño perpendicular a la longitud.

Los efectos antitumorales de cada grupo se expresaron como inhibición del crecimiento tumoral (TGI), que se calculó de la siguiente forma:

$$15 \quad \% \text{ TGI} = (1 - [\text{V medio del grupo de tratamiento}] \div [\text{V medio del grupo control}]) \times 100$$

Se clasificaron las respuestas del crecimiento tumoral como una respuesta completa (RC) si no hubo tumor medible.

9.3 Métodos Estadísticos

20 Se utilizó ANOVA de una vía para determinar las diferencias en el volumen medio de los tumores. En el caso de un test F significativo se utilizó un test de comparación múltiple de Dunnett o Sidak (en caso apropiado). En los casos en los que sea aplicable, se aplicó una transformación log
25 en base 10 a los volúmenes tumorales para tener en cuenta la heteroscedasticidad. Un valor $p < 0.05$ se consideró significativo.

9.4 Resultados

30 El tratamiento de ratones con mIgG2a OX86 resulta en un crecimiento significativamente reducido de células tumorales CT26 y MCA205 en comparación con ratones control no tratados

o negativos, o tratados con anticuerpos control del isotipo (Tabla 9-6, Tabla 9-7 y Tabla 9-8; Figura 26A, Figura 27A y Figura 28A). El tratamiento de ratones con mIgG2a OX86 resulta en un crecimiento retardado y reducido de células tumorales 4T1 en comparación con anticuerpo no tratado o control del isotipo (Tabla 9-9 y Figura 29A).

A menudo se muestra una respuesta mixta en modelos singeneicos; sin embargo, la respuesta drástica del tratamiento con mIgG2a OX86 es más clara de los gráficos de crecimiento de tumores en animales individuales (Figura 26B, Figura 27B, Figura 28B y Figura 29B). No se observó una respuesta a la dosis en ratones tratados con mIgG2a OX86 basado en TGI (Tabla 9-6, Tabla 9-7, Tabla 9-8 y Tabla 9-9; Figura 26A, Figura 27A, Figura 28A y Figura 29A) o con respecto a incrementar el número de animales que exhiben respuestas completas (Tabla 9-6, Tabla 9-7, Tabla 9-8 y Tabla 9-9).

Tabla 9-6 Grupos de Tratamiento, Porcentaje de Inhibición del Crecimiento del Tumor el Día 22, y número de Respondedores Completos en el Modelo Singeneico de CT26

Grupo ^a	Anticuerpo de Ensayo/Control	Dosis ^b (mg/kg)	% TGI ^c	Número de respondedores completos de 12 ratones ^d
1	Ninguno	NA	NA	0
2	OX86 mIgG2a	10	67	8
3	OX86 mIgG2a	3	67	6
4	OX86 mIgG2a	10	75	8
5	OX86 mIgG2a	0.3	65	8
6	OX86 mIgG2a	0.1	70	8

IP = intraperitoneal; NA = no aplicable; TGI = inhibición del crecimiento del tumor; V = volumen.

^a n = 12.

^b Todos los animales recibieron 200 µL de anticuerpo de
5 ensayo IP los Días 13 y 16.

^c % TGI = $(1 - [V \text{ medio del tumor del grupo de tratamiento}] \div [V \text{ medio del tumor del grupo control}]) \times 100$.

^d Número de animales en un grupo con una medida del volumen tumoral registrada como cero al final del estudio.

10 **Tabla 9-7 Grupos de Tratamiento, Porcentaje de Inhibición del Crecimiento del Tumor el Día 26, y número de Respondedores Completos en el Modelo Singeneico de CT26**

15	Grupo ^a	Anticuerpo de Ensayo/Control	Dosis ^b (mg/kg)	% TGI ^c	Número de respondedores completos de 10 ratones ^d
	1	Ninguno	NA	NA	1
20	2	Control negativo (OX86 mIgG1 D265A)	2.5	NA	1
	3	OX86 mIgG2a	2.5	94	7
	4	OX86 mIgG2a	1.0	97	8
25	5	OX86 mIgG2a	0.25	95	6
	6	OX86 mIgG2a	0.1	92	7

IP = intraperitoneal; NA = no aplicable; TGI = inhibición del crecimiento del tumor; V = volumen.

^a n = 10.

^b Todos los animales recibieron 200 µL de anticuerpo de
30 ensayo IP los Días 9 y 12.

^c % TGI = (1 - [V medio del tumor del grupo de tratamiento] ÷ [V medio del tumor del grupo control]) x 100.

^d Número de animales en un grupo con una medida del volumen tumoral registrada como cero al final del estudio.

5 **Tabla 9-8 Grupos de Tratamiento, Porcentaje de Inhibición del Crecimiento del Tumor el Día 22, y número de Respondedores Completos en el Modelo Singeneico de MCA205**

10	Grupo ^a	Anticuerpo de Ensayo/Control	Dosis ^b (mg/kg)	% TGI ^c	Número de respondedores completos de 14 ratones ^d
	1	Ninguno	NA	NA	0
15	2	Isotipo del control (mezcla)	20	NA	0
	3	OX86 mIgG2a	20	65	0
	4	OX86 mIgG2a	10	76	4
	5	OX86 mIgG2a	5	70	2

20 **Tabla 9-9 Grupos de Tratamiento, Porcentaje de Inhibición del Crecimiento del Tumor el Día 25, y número de Respondedores Completos en el Modelo Singeneico de 4T1**

25	Grupo ^a	Anticuerpo de Ensayo/Control	Dosis ^b (mg/kg)	% TGI ^c	Número de respondedores completos de 12 ratones ^d
	1	Ninguno	NA	NA	0
30	2	Isotipo del control (mezcla)	70	NA	0
	3	OX86 mIgG2a	10	5	0
	4	OX86 mIgG2a	5	34	2

Grupo ^a	Anticuerpo de Ensayo/Control	Dosis ^b (mg/kg)	% TGI ^c	Número de respondedores completos de 12 ratones ^d
5	OX86 mIgG2a	2.5	37	0
6	OX86 mIgG2a	1.0	22	0
7	OX86 mIgG2a	0.25	ND	0

IP = intraperitoneal; NA = no aplicable; TGI = inhibición del crecimiento del tumor; V = volumen; ND = no determinado.

^a n = 12.

^b Todos los animales recibieron 200 µL de anticuerpo de ensayo IP los Días 13, 16, 20 y 23.

^c % TGI = $(1 - [V \text{ medio del tumor del grupo de tratamiento}] \div [V \text{ medio del tumor del grupo control}]) \times 100$.

^d Número de animales en un grupo con una medida del volumen tumoral registrada como cero al final del estudio.

9-5 Conclusiones

El tratamiento con un único agente de ratones portadores de tumores con mIgG2a OX86 resulta en una actividad anti-tumoral que reduce significativamente el crecimiento de múltiples tumores en comparación con grupos no tratados, de control negativo y/o tratados con control del isotipo.

EJEMPLO 10: Caracterización del Epítipo de OX40mAb24

Este ejemplo examina el epítipo de OX40mAb24 utilizando una serie de variantes quiméricas de OX40 humano/ratón.

10.1 Materiales utilizados en este estudio y su fuente se enumeran en la Tabla 10-1.

Tabla 10-1 Materiales

Elemento	Fuente
IgG-Alexa480 anti-humano	Invitrogen (Carlsbad, CA)

	Elemento	Fuente
	IgG-Alexa480 anti-oveja	Invitrogen (Carlsbad, CA)
	IgG-Alexa480 anti-cabra	Invitrogen (Carlsbad, CA)
5	Células 293 FreeStyle (células HEK293F)	Invitrogen (Carlsbad, CA)
	Anticuerpo policlonal OX40 anti-ratón de cabra	R&D Systems (Minneapolis, MN)
	Citómetro de flujo LSRII	BD Biosciences (San Jose, CA)
10	Solución salina tamponada con fosfato	Invitrogen (Carlsbad, CA)
	Anticuerpo policlonal OX40 anti-humano de oveja	R&D Systems (Minneapolis, MN)
15	Reactivo de transfección 293fectina	Invitrogen (Carlsbad, CA)

10.2 Generación de Variantes Quiméricas Humanas/Ratón

OX40mAb24 se une específicamente a OX40 humano (SEQ ID NO: 91) y no reconoce OX40 de ratón (SEQ ID NO: 92) a pesar de compartir un 60% de identidad en su secuencia de aminoácidos (aa) (Figura 30). Variantes de OX40 quiméricas humanas/ratón se modificaron intercambiando porciones del dominio extracelular entre OX40 humana y de ratón. Las construcciones de ADNc de OX40 humana y de ratón se utilizaron como moldes en la PCR de extensión por solapamiento para construir variantes quiméricas con un dominio de transmembrana para la expresión en la superficie de la célula de las proteínas recombinantes. OX40 es una proteína de aproximadamente 45 kDa con tres dominios ricos en cisteína (CRDs) completos y un dominio rico en cisteína truncado. La estructura es característica de la superfamilia de TNFR.

Se construyeron trece variantes inactivadas quiméricas (K0/pérdida de función) reemplazando los siguientes residuos del dominio extracelular de OX40 humana con los correspondientes aa de OX40 de ratón o Alanina (Figura 31):

- 5 • • CRD1 (OX40 humana aa 29 a 65 reemplazados por los homólogos de ratón);
- • CRD2 (OX40 humana aa 66 a 107 reemplazados por los homólogos de ratón);
- 10 • • CRD3 (OX40 humana aa 108 a 146 reemplazados por los homólogos de ratón);
- • CRD4+enlazador (OX40 humana aa 147 a 214 reemplazados por los homólogos de ratón);
- 15 • • CRD3+4 (OX40 humana aa 108 a 167 reemplazados por los homólogos de ratón);
- • A¹¹¹ (OX40 humana aa alanina 111 reemplazada por su homólogo prolina de ratón);
- • L¹¹⁶ (OX40 humana aa leucina 116 reemplazada por su homólogo glutamina de ratón);
- 20 • • P¹²¹ (OX40 humana aa prolina 121 reemplazada por su homólogo leucina de ratón);
- • A¹²⁶ (OX40 humana aa alanina 126 reemplazada por su homólogo valina de ratón);
- 25 • • D¹³⁷ (OX40 humana aa ácido aspártico 137 reemplazada por su homólogo asparagina de ratón);
- • A¹¹¹P¹²¹D¹³⁷ (OX40 humana aa Ala¹¹¹, Pro¹²¹ y Asp¹³⁷ reemplazadas por los homólogos de ratón);
- • L¹¹⁶A¹²⁶ (OX40 humana aa Leu¹¹⁶ y Ala¹²⁶ reemplazadas por los homólogos de ratón); y
- 30 • • D¹¹⁷S¹¹⁸ (OX40 humana aa Asp¹¹⁷ y Ser¹¹⁸ reemplazadas por mutaciones Ala).

Además, se construyeron cinco variantes activadas (KI(ganancia de función) injertando los siguientes residuos de OX40 humana en OX40 de ratón, utilizando el mismo método que el arriba descrito para las construcciones de K0 (Figura 31):

- CRD3 (OX40 humana aa 108 a 146 injertados en las correspondientes regiones de ratón);
- A¹¹¹ (OX40 humana aa alanina 111 injertada en la correspondiente posición de ratón);
- L¹¹⁶ (OX40 humana aa leucina 116 injertada en la correspondiente posición de ratón);
- A¹²⁶ (OX40 humana aa alanina 126 injertada en la correspondiente posición de ratón);
- L¹¹⁶A¹²⁶ (OX40 humana aa leucina 116 y alanina 126 injertadas en las correspondientes posiciones de ratón).

Los ADNs quiméricos resultantes se encerraron en un vector de expresión de mamíferos pEBNA para la expresión transitoria en mamíferos. Células 293F se sembraron a una densidad de 0.7×10^6 células/mL un día antes de la transfección. Tres microgramos y medio de cada uno de los vectores de expresión se transfectaron en 5 mL de células HEK293 F utilizando 5 μ L de reactivo de transfección 293fectina siguiendo las instrucciones del fabricante.

10.3 Caracterización de la Unión de OX40mAb24 a Variantes Quiméricas de OX40

Cuarenta y ocho horas después de la transfección, células HEK293F se incubaron con 1 μ g/mL de OX40mAb24 durante 1 hora sobre hielo en PBS. Para detectar OX40mAb24 unido por citometría de flujo, las células se lavaron 3 veces con PBS frío, se incubaron con 1 μ g/mL de anticuerpo IgG anti-

humano conjugado con Alexa480 durante 1 h en hielo y después se analizaron utilizando el citómetro de flujo LSRII.

Los niveles de expresión de todas las variantes quiméricas de OX40 también se vigilaron por citometría de flujo, las células se incubaron con una mezcla de anticuerpos policlonales OX40 anti-humano de oveja y OX40 anti-ratón de cabra a 1 µg/mL en PBS durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron tres veces con PBS frío y luego se incubaron con una mezcla de anticuerpos policlonales IgG anti-cabra y anti-oveja conjugados con Alexa480. Después de lavar 3 veces con PBS frío, las células se analizaron con el citómetro de flujo LSRII.

10.4 Resultados

El epítipo de OX40mAb24 se caracterizó utilizando variantes quiméricas humanas/ratón. OX40 humana y OX40 de ratón comparten un 60% de identidad en la secuencia de aa (Figura 30); sin embargo, OX40mAb24 se une específicamente a OX40 humana y no reconoce OX40 de ratón. Esta especificidad se empleó para identificar el epítipo de OX40mAb24. Se construyeron dieciocho variantes quiméricas intercambiando diversos dominios del dominio extracelular de OX40 de ratón en OX40 humana (KO/variantes de pérdida de función) o de OX40 humana en OX40 de ratón /KI/variantes de ganancia de función) (Figura 31). Todas las variantes codificaron un dominio de transmembrana para la expresión en la superficie celular de la proteína quimérica. Las características de unión de OX40mAb24 a estas variantes se analizaron por citometría de flujo.

El epítipo de OX40mAb24 se mapeó al dominio CRD3 de OX40 humana intercambiando dominios individuales entre OX40 humanas y de ratón. La unión de OX40mAb24 a OX40 humana se

abolió cuando se reemplaza el dominio CRD3 humano por el homólogo de ratón (KO_CRD3 y KO_CRD3-4) (Figura 32A-C). El reemplazo de los otros dominios de CRD humanos con regiones de ratón no afectó a la unión de OX40mAb24(KO_CRD1, KO_CRD2 y KO_CRD4+enlazador). Además, el injerto del dominio CRD3 humano en OX40 de ratón condujo a la unión de OX40mAb24 (KI_CRD3). Todas las variantes se expresaron tal como se vigilaron por parte de anticuerpos policlonales OX40 anti-humanos y de ratón (Figura 32A-C). El mAb potencial de OX40mAb24, 9B12, también se caracterizó en el estudio de unión. 9B12 mostró los mismos perfiles de unión a estas variantes que OX40mAb24, sugiriendo que ambas IgGs reconocen el mismo epítipo del dominio CRD3.

Además, residuos de epítipo críticos Leu¹¹⁶ y Ala¹²⁶ se identificaron en el dominio CRD3 mutando los aminoácidos que son diferentes entre OX40s humana y de ratón. Cinco aminoácidos, incluyendo Ala¹¹¹, Leu¹¹⁶, Pro¹²¹, Ala¹²⁶ y Asp¹³⁷ (Figura 30) en el dominio CRD3 humano se mutaron a los correspondientes residuos de ratón o Ala como aminoácidos individuales o combinaciones diferentes (Figura 31). La unión de OX40mAb24 se abolió cuando se reemplazaban los residuos Leu¹¹⁶ y Ala¹²⁶ por los homólogos de ratón (KO_L¹¹⁶+A¹²⁶). Además, las variantes KI/ganancia de función confirmaron la importancia de estos dos residuos críticos. El injerto de Leu¹¹⁶, Ala¹²⁶, o la combinación en OX40 de ratón condujeron a la unión de OX40mAb24.

10.5 Conclusiones

El epítipo OX40mAb24 se mapeó en el dominio CRD3 de OX40 humana utilizando variantes quiméricas humanas/ratón, con residuos críticos Leu¹¹⁶ y Ala¹²⁶. Los perfiles de unión a todas las variantes entre OX40mAb24 y su 9B12 parental

son idénticos, indicando que reconocen el mismo epítopo en OX40 humana.

EJEMPLO 11: Actividad farmacocinética del Anticuerpo Quimérico IgG2a OX40 Anti-Ratón de Rata/Ratón Clon OX86 en
5 Ratones Naif y en Ratones Portadores de Tumores Singeneicos
OX86 es un anticuerpo IgG1 anti-mOX40 de rata que se une a y desencadena la señalización de MOX40 (al-Shamkhani *et al*, 1996), y tiene actividad anti-tumoral en modelos de cáncer en ratones inmunocompetentes (Weinberg *et al*, 2000).
10 Para estudiar más a fondo los efectos del agonismo de OX40 utilizando un anticuerpo sustituto de ratón con propiedades funcionales similares a OX40mAb24, este ejemplo utiliza el anticuerpo de la quimera IgG2a anti-mOX40 de rata/ratón OX86 descrito en el Ejemplo 9. Sin embargo, es posible trazar
15 algunas paralelas entre las especies, por ejemplo mIgG2a e IgG1 humana se consideran a menudo de función equivalente, ya que ambos isotipos son capaces de unir múltiples receptores Fcγ, son capaces de la unión del receptor Fcγ de alta afinidad y son capaces de desencadenar ADCC y unirse a
20 C1q humana, un requisito previo para la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) por la vía clásica del complemento (Stewart *et al*. 2014; Dall'Acqua *et al*, 2006). El mIgG2a OX86 se une a OX40 de ratón (véase el Ejemplo 9) y se utilizó como un sustituto del agonista OX40 de ratón
25 para OX40mAb24.

En este ejemplo, se estudia la capacidad de mIgG2a OX86 de inducir células T en ratones naif y portadores de tumores y de penetrar en el ciclo celular y proliferar. Además, se evaluaron K167 e ICOS como un biomarcador potencial de la
30 actividad agonista de OX40 y se investigó. La proliferación de células T y la actividad anti-tumoral se determinaron en

dos modelos de cáncer de ratón singeneicos. Además, finalmente, se determinó el papel que juegan los receptores Fcγ activantes (receptores Fcγ I, III y IV) y/o inhibidores (receptor Cγ IIb) en la actividad *in vivo* de mIgG2a OX86.

5 11.1 Materiales y Métodos

11.1.1 Recepción e Identificación de los Animales

Ratones BALB/c Fcgr2b^{-/-} o Fcer1g^{-/-} y C57BL/6 Fcgr2b^{-/-} o Fcer1g^{-/-} de tipo salvaje de 6-8 semanas de edad fueron recibidos en MedImmune de Harlan Laboratories, Inc.
10 (Indianapolis, IN o Charles River Laboratories (Reino Unido)) y se dejó que se aclimataran durante ≤15 días antes de comenzar el estudio. Después, a los ratones se les implantaron transpondedores de microchip para identificar ratones individuales.

15 11.1.2 Alojamiento

Los animales fueron tratados de forma humanitaria y alojados de acuerdo con protocolos aprobados por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales Institucional (EE.UU.) y la el Ministerio del Interior (Reino unido) en las
20 instalaciones de Fuentes de Animales de Laboratorio (EE.UU.) y en la Unidad de Ciencias Biológicas (Reino Unido) en MedImmune, una Asociación para la Acreditación de Animales de Cuidado de Animales de Laboratorio en las Instalaciones licenciadas por el Departamento de Agricultura de Estados
25 Unidos. Los animales se mantuvieron en unidades de micro-aislador estériles , se les proporcionó un lecho estéril y alimentos y agua potable acidificada (EE.UU.) o agua del grifo (Reino Unido) ad libitum. Las condiciones ambientales fueron las normalizadas (temperatura ambiente: 20°C ± 1°C
30 (EE.UU.) o 21°C ± 1°C (Reino Unido); humedad relativa: 50% ± 10% (EE.UU.) o 55 ± 10% (Reino Unido); ciclo de 12 horas

de luz-oscuridad). Los animales fueron vigilados diariamente en cuanto a signos clínicos adversos y bi-semanalmente en cuanto al peso corporal. En caso de notar parálisis de las extremidad posteriores, estrés respiratorio, pérdida del 20%
5 de peso corporal, o volumen tumoral mayor de 2000 mm³, los animales se sacrificaron inmediatamente de forma humana por dislocación cervical o asfixia con CO₂.

11.1.3 Establecimiento de Tumores Singeneicos

La línea celular CT26 (carcinoma de colon de ratón) se
10 obtuvo de ATCC, Manassas, VA, y la línea celular MCA 205 (sarcoma de tejido blando de ratón químicamente inducido) se obtuvo de Providence Cáncer Center, Portland, OR. Ambas líneas celulares se mantuvieron en medio RPMI 1640 + FBS al 10% a 37°C, 5% de CO₂.

15 Se establecieron aloinjertos mediante inyección subcutánea de 5.0×10^5 células CT26, resuspendidas en 0.1 mL de PBS, en el flanco derecho de ratones BALB/c de 7 a 9 semanas de edad de tipo salvaje, Fcgr2b^{-/-} o Fcer1g^{-/-}. También se establecieron aloinjertos mediante inyección SC de $2.5 \times$
20 10^5 células MCA205, resuspendidas en 0.1 mL de PBS, en el flanco derecho de ratones C57BL/6 de 7 a 9 semanas de edad de tipo salvaje, Fcgr2b^{-/-} o Fcer1g^{-/-}.

11.1.4 Aleatorización, Designación de Grupos y Niveles de Dosis

25 En este estudio se utilizaron ratones hembras BALB/c de tipo salvaje (n=70), Fcgr2b^{-/-} (n=36) o Fcer1g^{-/-} (n=36) y ratones hembras C57BL/6 Fcgr2b^{-/-} (n=36) o Fcer1g^{-/-} (n=36). Todos los ratones fueron asignados aleatoriamente a los grupos de tratamiento. Las designaciones de grupos, el número
30 de animales, los niveles de dosis y el programa de dosis se presentan en la Tabla 11-1, Tabla 11-2, y Tabla 11-3. Todos

los artículos de ensayo y artículos de control fueron administrados por vía intraperitoneal (IP). No hubo sustituciones de animales.

Animales de cada uno de los grupos fueron sacrificados cuando los volúmenes de los tumores alcanzaron aproximadamente 2000 mm³ o cuando los tumores se volvieron ulcerados o necróticos.

Tabla 11-1 Designación de Grupos y Niveles de Dosis de Ratones BALB/c Naif

Grupo	Número de animales (M/F)	Tratamiento	Programa de la dosis (día del estudio)	Nivel de dosis (mg/kg) ^a	ROA
1, 9	7 (F), 7 (F)	Solución salina	1	NA	IP
3, 11	7 (F), 7 (F)	Control isotipo (NIP228 IgG2a)	1	20	IP
4, 12	7 (F)	OX86 mIgG2a	1	20	IP
5, 13	7 (F), 7 (F)	OX86 mIgG2a	1	2	IP
6, 14	7 (F), 7 (F)	OX86 mIgG2a	1	0.2	IP

F = hembra; M = macho; NA = no aplicable; IP = intraperitoneal; ROA = vía de administración; OX86 mIgG2a = variante de OX86 de anticuerpo monoclonal IgG2a OX40 anti-ratón de ratón

^a Volumen de la dosis: 0.2 mL para solución salina o volumen ajustado al peso corporal; 10 mL/kg para todos los otros grupos.

Tabla 11-2 Designación de Grupos y Niveles de Dosis en el Modelo Singeneico de CT26

5

10

15

20

25

30

Grupo	Número de animales (M/F)	Ratón Raza	Tratamiento	Programa de la dosis (día del estudio)	Nivel de dosis (mg/kg) ^a	ROA
1	8 (F)	Balb/c Fcgr2b -/-	Ninguno	NA	NA	IP
2	8 (F)		Control (OX86 mIgG1 D265A)	4, 7	2.5	IP
3	8 (F)		OX86 mIgG2a	4, 7	2.5	IP
4	8 (F)	Balb/c Fcer1g -/-	Ninguno	NA	NA	IP
5	8 (F)		Control (OX86 mIgG1 D265A)	4, 7	2.5	IP
6	8 (F)		OX86 mIgG2a	4, 7	2.5	IP

F = hembra; M = macho; NA = no aplicable ya que los animales no fueron tratados; IP = intraperitoneal; ROA = vía de administración; OX86 mIgG2a = regiones variables de cadena ligera y cadena pesada anti-OX40 de rata del clon OX86 con regiones constantes de IgG2a de ratón.

^a Volumen de la dosis: 0.2 mL.

Tabla 11-3 Designación de Grupos y Niveles de Dosis en el Modelo Singeneico de MCA205

5	Grupo	Número de animales (M/F)	Ratón Raza	Tratamiento	Programa de la dosis (día del estudio)	Nivel de dosis (mg/kg) ^a	ROA
10	1	8 (F)	C57BL/6 Fcgr2b ^{-/-}	Ninguno	NA	NA	IP
15	2	8 (F)		Control (OX86 mIgG1 D265A)	4, 7	7.5	IP
	3	8 (F)		OX86 mIgG2a	4, 7	7.5	IP
20	4	8 (F)	C57BL/6 Fcer1g ^{-/-}	Ninguno	NA	NA	IP
	5	8 (F)		Control (OX86 mIgG1 D265A)	4, 7	7.5	IP
25	6	8 (F)		OX86 mIgG2a	4, 7	7.5	IP

F = hembra; M = macho; NA = no aplicable ya que los animales no fueron tratados; IP = intraperitoneal; ROA = vía de administración; OX86 mIgG2a = regiones variables de cadena ligera y cadena pesada anti-OX40 de rata del clon OX86 con regiones constantes de IgG2a de ratón.

^a Volumen de la dosis: 0.2 mL.

11.1.5 Mediciones de los Tumores

Los tumores se midieron mediante calibrado dos veces por semana y los volúmenes de los tumores se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

5 volumen del tumor = [longitud (mm) x anchura (mm)²] /2
 en donde la longitud se definió como el lado más largo y la anchura como el lado más pequeño perpendicular a la longitud.

Los efectos antitumorales de cada grupo se expresaron
10 como inhibición del crecimiento tumoral (TGI), que se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ TGI} = (1 - [\text{V medio del tumor del grupo de tratamiento}] \div [\text{V medio del tumor del grupo control}]) \times 100$$

15 11.1.6 Recogida de Tejido y Aislamiento de Células Individuales

11.1.6.1 Preparación de Glóbulos Rojos de Ratón para el Análisis por Citometría de Flujo

Tampón de lisis de glóbulos rojos (RBCL) (2 mL) se añadió a sangre (50 µL) y se incubó durante 5 min. Los
20 volúmenes obtenidos de sangrado in vivo oscilaban entre 20 µL y 50 µL. Los sangrados terminales eran 50 µL. A cada una de las muestras se añadió RPMI + suero bovino fetal (FBS) al 10% (8 mL). Las células en cada una de las muestras se sedimentaron (300 x g, 5 min) y luego se resuspendieron en
25 0.3 mL de Tampón Flow. Suspensiones de células (200 µL) se añadieron a cada uno de los pocillos de una placa de fondo redondo de 96 pocillos para la tinción con anticuerpo fluorescentes. Muestras agrupadas se utilizaron para los controles no teñidos, la tinción con un solo anticuerpo,
30 tinción con el isotipo y tinción con el anticuerpo fluorescencia-menos-uno (FMO).

11.1.6.2 Ganglios Linfáticos de Drenaje de Ratón y Aislamiento del Bazo y Generación de Suspensiones de Células Individuales para el Análisis por Citometría de Flujo

Los bazos se colocaron en 10 mL de RPMI + disolución 1X Pen/Strep y se hicieron pasar a través un filtro celular de 40 μ m. Las muestras se sedimentaron (300 x g, 5 min) y luego se resuspendieron en 1 mL de tampón RBCL durante 3 min. A cada una de las muestras se añadió RPMI + FBS al 10% (9 mL). Las suspensiones de células se sedimentaron (300 x g, 5 min) y se resuspendieron en 1 mL de tampón Flow. Suspensiones de células (100 μ L) se añadieron a cada uno de los pocillos de una placa de fondo redondo de 96 pocillos para la tinción con anticuerpo fluorescentes. Muestras agrupadas se utilizaron para los controles no teñidos, la tinción con un solo anticuerpo, tinción con el isotipo y tinción con el anticuerpo FM0.

11.1.6.3 Preparación de una Suspensión de Células individuales de Tumores de Ratón para el Análisis por Citometría de Flujo

Los tumores se escindieron asépticamente de ratones eutanizados, teniendo cuidado en evitar recoger tejido conjuntivo o piel, y se dispusieron en collagenasa diluida con solución salina equilibrada de Hanks en una placa de 6 pocillos. Para aumentar la eficacia del proceso de digestión enzimático, cada uno de los tumores se desmenuzó con un bisturí o un pequeño para de agujas afiladas en trozos más pequeños. Los tumores desmenuzados se transfirieron a tubos cónicos de 15 mL y se colocaron en una plataforma agitadora para la incubación a 37°C durante 20-30 minutos. A cada una de las muestras se añadieron cinco mL de RPMI + FBS al 10% para desactivar la collagenasa y mantener la viabilidad de

las células inmunes. Las muestras se hicieron pasar a través de un filtro de células de 70 μ M y se colocaron en tubos cónicos de 50 mL. Para el recuento se separó una parte alícuota de cada una de las muestras. La cantidad restante
5 de muestra se sedimentó en una centrífuga a 330 x g y se resuspendió en tampón FACS (PBS + FBS al 2%) a una concentración de 1×10^7 células por mL.

,

11.1.7 Análisis por Citometría de Flujo

10 11.1.7.1 Análisis de Tejidos de Ratones no portadores de Tumores

Suspensiones de células individuales de glóbulos rojos o células del bazo se sedimentaron (300 x g, 5 min), se resuspendieron en 50 μ L de solución de Bloqueo Fc (1:50), se
15 diluyeron en tampón eBiosciences Flow y se incubaron durante 10 min en hielo. Cincuenta microlitros de anticuerpos marcados de forma fluorescente (disolución patrón 2X) se añadieron a cada una de las muestras (volumen final 100 μ L). Disoluciones de tinción de anticuerpos individuales
20 (extracelulares) se añadieron a razón de 1 μ L por pocillo y mezclas de células/anticuerpos se incubaron durante 30 min en hielo. Las células se sedimentaron (300 x g, 5 min), se lavaron dos veces (200 μ L de tampón Flow por pocillo, 300 x g, 5 min), se resuspendieron en 50 μ L de tampón Fix/Penn
25 (una parte de concentrado a tres partes de diluyente) y luego se incubaron durante la noche a 4°C en la oscuridad.

Las células tratadas se lavaron dos veces en Tampón de Permeabilización 1X (diluido en agua). Anticuerpos de marcaje intracelular se diluyeron en Tampón de
30 Permeabilización (100 μ L por pocillo) y se añadieron a las células, que después se incubaron a temperatura ambiente en

la oscuridad durante 30 minutos. Anticuerpos para la tinción de marcadores individuales (intracelular) se añadieron a las células a razón de 1 μ L por pocillo en 100 μ L de Tampón de Permeabilización y se incubaron durante 30 min en hielo en la oscuridad. Las células se lavaron una vez en Tampón de Permeabilización y se resuspendieron en disolución de formaldehído al 3.7% (100 μ L) antes de ser analizadas en un citrómetro de flujo Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA).

11.1.7.2 Análisis de Tejidos de Ratones portadores de Tumores

11.1.7.2.1 Tinción de la superficie de las células

Cada una de las muestras de células sedimentadas se resuspendió en tampón FACS. Mezclas de anticuerpos fluorescentes en tampón FACS se añadieron a pocillos apropiados y se incubaron durante 20-30 minutos a 4°C en la oscuridad. Las células se lavaron dos veces con Tampón FACS, se resuspendieron en Tampón FACS y se analizaron en un citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA).

11.1.7.2.2 Tinción intracelular (células fijadas y permeabilizadas)

Cada una de las muestras de células sedimentadas se resuspendió en 50 μ L de una dilución 1:500 de colorante azul fijable por fluorescencia para la discriminación de células vivas/no viables, y se incubó durante 15 minutos a 4°C en la oscuridad. Las células se lavaron una vez con Tampón FACS, se resuspendieron en 30 μ L de PBS + suero de ratón normal al 4% que contenía Bloqueo Fc y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Mezclas de anticuerpos fluorescentes en Tampón FACS se añadieron a pocillos apropiados y se incubaron durante 20-30 minutos a 4°C en la oscuridad. Las células se lavaron dos veces con Tampón FACS, se

resuspendieron en 150 μ L de disolución de trabajo FoxP3 Fix/Pen recientemente preparada y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Las células se lavaron dos veces con Tampón de Permeabilización 1X, se resuspendieron en 100 μ L de Tampón de Permeabilización 1X que contenía anticuerpos para teñir los antígenos intracelulares, y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Las células se lavaron una vez con Tampón de Permeabilización 1X, se resuspendieron en Tampón FACS y se analizaron en un citómetro de flujo LSRII.

11.1.8 Métodos Estadísticos

Se utilizó ANOVA de una vía para determinar las diferencias en el volumen medio de los tumores y el porcentaje medio de células Ki67+ o ICOS+. En el caso de un test F significativo, se utilizó un test de comparación múltiple de Dunnett o Sidak (en los casos en que fuera apropiado). En los casos en los que sea aplicable, se aplicó una transformación log en base 10 a los volúmenes tumorales medios para tener en cuenta la heteroscedasticidad. Un valor $p < 0.05$ se consideró significativo. Se empleó GraphPad Prism 6.0 para el análisis de regresión lineal que generó la mejor línea de ajuste que mejor predijo Y a partir de X, el nivel de significancia estadística de la línea y la bondad de ajuste (r^2) de la mejor línea de ajuste determinada.

11.1.9 MATERIALES

Materiales utilizados en este estudio y su fuente se enumeran en la Tabla 11-4 y la Tabla 11-5.

Tabla 11-4 Materiales

	Elemento	Fuente
	Tripsina-EDTA al 0.25% (1X)	Life Technologies, Carlsbad, CA
5	Tampón de Permeabilización 10 x	eBioscience, Reino Unido
	Disolución de formaldehído al 3.7%	Sigma-Aldrich, Reino Unido
10	Filtros de células de 40 y 70 µm	Corning Life Sciences, Tewksbury, MA
	Colagenasa tipo 3	Worthington Biochem Corp., Lakewood, NJ
	Bloque Fc	eBioscience, Reino Unido
15	Suero bovino fetal, activado por calor	Life Technologies, Carlsbad, CA
	Concentrado de Fijación/Permeabilización	eBioscience, Reino Unido
	Diluyente de Fijación/Permeabilización	eBioscience, Reino Unido
20	Tampón Flow	eBioscience, Reino Unido
	Kit FoxP3 Fix/Perm	eBioscience, Reino Unido
	Solución salina tamponada de Hanks	Life Technologies USA
25	FBS Irradiado con Gamma e Inactivado por Calor FBS para la neutralización por Tampón RBCL	SASC Biosciences, KS, EE.UU.
	Citómetros de Flujo LSRII y Canto II	BD Biosciences, San Jose, CA
30	Suero de ratón normal	Jackson Labs, Bar harbor, MA

	Elemento	Fuente
	Disolución Pen/Strep	Life Technologies UK
	Tampón de Permeabilización	eBiosciences, EE.UU.
5	PBS, solución salina tamponada con fosfato, pH 7.2	Life Technologies, Carlsbad, CA
	Tampón de Lisis de Glóbulos Rojos	Sigma, Reino Unido
10	Medio de Roswell Park Memorial Institute 1640	Life Technologies, Carlsbad, CA

Tabla 11-5 Anticuerpos Fluorescentes para Estudios de Citometría de Flujo

	Elemento	Fuente
15	IgG2a anti-CD4 de Rata conjugado con APC	eBioscience, Reino Unido
	mIgG2a anti-MHC2 conjugado con FITC	eBiosciences USA
	IgG2a anti-CD8 de Rata conjugado con APC-H7	eBioscience, Reino Unido
20	IgG2a anti-Ki67 de Rata conjugado con EFluor 480	eBioscience, Reino Unido
	IgG2a de Rata control del isotipo conjugado con APC	eBioscience, Reino Unido
25	IgGa de Rata control del isotipo conjugado con APC-H7	eBioscience, Reino Unido
	IgG2a de Rata control del isotipo conjugado con eFluor	eBioscience, Reino Unido
	IgG2b de Rata control del isotipo conjugado con PE	eBioscience, Reino Unido
30	rIgG2a Ki67 conjugado con PECy7	eBioscience, EE.UU.

Elemento	Fuente
rIgG2a anti-CD4 conjugado con BV605	Biolegend USA
rIgG2a anti-CD8 conjugado con BV711	Biolegend USA
Azul Fijable	Life Technologies, EE.UU.
rIgG2a control del isotipo conjugado con PECy7	Biolegend USA

11.2 RESULTADOS

El tratamiento intraperitoneal de ratones naif con el anticuerpo anti-OX40 IgG2a de ratón OX86 (OX86 mIgG2a) resultó en un incremento dependiente de la dosis significativo y transitorio en el porcentaje de células T CD4⁺ Ki67⁺ y CD4⁺ ICOS⁺ en la sangre a lo largo del tiempo, en comparación con ratones tratados con artículos control (Figura 33A y C). El porcentaje más alto de células T CD4⁺ Ki67⁺ y CD4⁺ ICOS⁺ se detectó el Día 10. Se midió un incremento significativo en el porcentaje de células T CD4⁺ Ki67⁺ y CD4⁺ ICOS⁺ en los bazo de ratones el Día 10 después de la administración de OX86 mIgG2a en comparación con ratones tratados con artículos control (Figura 33B y D). Se identificó el Día 10 una correlación estadísticamente significativa y fuerte entre el porcentaje de células T CD4⁺ Ki67⁺ y células T CD4⁺ ICOS⁺ en la sangre y el bazo (Figuras 34A y 34B).

El tratamiento de ratones naif con el OX86 mIgG2a resultó en un incremento significativo y transitorio en el porcentaje de células T CD8⁺ Ki67⁺ en la sangre a lo largo del tiempo, en comparación con ratones tratados con artículos control (Figura 35A). Incrementos en el porcentaje de células T CD8⁺ ICOS⁺ en la sangre a lo largo del tiempo (Figura 35C)

y el porcentaje de células T CD8+ Ki67+ en el bazo el Día 10 (Figura 35B) se detectaron tras el tratamiento con OX86 mIgG2a, pero no eran estadísticamente significativos cuando se comparaban con el tratamiento con artículos control. El

5 tratamiento de ratones naif con OX86 mIgG2a indujo un incremento significativo, dependiente de la dosis, en el porcentaje de células T CD8+ ICOS+ en el bazo el Día 10, en comparación con ratones tratados con artículos control (Figura 35D). Se determinó una correlación moderada, pero

10 significativa entre el porcentaje de células T CD8+ Ki67+ y células T CD8+ ICOS+ en la sangre y el bazo (Figuras 36A y 36B).

El tratamiento con único agente de ratones de tipo salvaje portadores de tumores con OX86 mIgG2a resulta en una

15 actividad antitumoral que reduce el crecimiento de dos tumores histológicamente diferentes en comparación con grupos no tratados y tratados con control del isotipo (Véase el Ejemplo 9). El tratamiento con OX86 mIgG2a resultó en un crecimiento significativamente reducido de tumores MAC205 el

20 Día 20 (Figura 38A, Tabla 11-7) en comparación con el tratamiento con artículos control en ratones C57BL/6 que se modificaron genéticamente para que perdieran la expresión del receptor Fcγ inhibidor IIB (ratones Fcgr2b^{-/-}). Un

tratamiento idéntico de ratones con tumores CT26 resultó en

25 un crecimiento reducido de tumores que no alcanzaba una significancia estadística el Día 18 (Figura 37A, Tabla 11-6) cuando se compara con el tratamiento con artículos control en ratones BALB/c Fcgr2b^{-/-}. No se observó una inhibición del crecimiento, por parte de agente alguno, en ratones

30 BALB/c y C57BL/6 portadores de tumores, genéticamente modificados para perder la expresión de los receptores Fcγ

activantes (ratones Fcgr1g^{-/-}; Figura 37C; Figura 38C). En modelos singeneicos se observa a menudo una respuesta singeneica. Sin embargo, la respuesta anti-tumoral tras el tratamiento con OX86 mIgG2a en las dos diferentes cepas de ratones inactivados con el receptor Fcγ también se puede discernir de las gráficas de crecimiento del tumor en animales individuales (Figura 37B y D; Figura 38B y D); el tratamiento con OX86 mIgG2a resultó en la inhibición del crecimiento de tumores CT26 y MCA205 y, en algunos casos, indujo respuestas completas en ratones Fcgr2b^{-/-} (Figura 37B; Figura 38B).

Tabla 11-6 Grupos de Tratamiento y Porcentaje de TGI y Número de Respondedores Completos en el Modelo de Ratón Singeneico CT26

Grupo ^a	Ensayo/Artículo del control	Dosis ^b (mg/kg)	Cepa de Ratón	% TGI ^c	Número de respondedores completos de 8 ratones ^d
1	Ninguno	NA	Balb/c Fcgr2b ^{-/-}	NA	0
2	Control isotipo	2.5 mg/kg		NA	0
3	OX86 mIgG2a	2.5 mg/kg		15	0
4	Ninguno	NA	Balb/c Fcgr1g ^{-/-}	NA	0
5	Isotipo del control	2.5 mg/kg		NA	0
6	OX86 mIgG2a	2.5 mg/kg		< 0	0

TGI = inhibición del crecimiento tumoral; NA = no aplicable; IP = intraperitoneal; V = volumen

^a Número de animales por grupo: 8.

^b Todos los animales recibieron 200 μ l de artículo de ensayo IP los días 4 y 7.

^c % TGI = $[1 - (V \text{ medio del tumor } V \text{ del grupo de tratamiento}) \div (V \text{ medio del tumor de grupo control})] \times 100$; calculado el Día 18 para ratones Fcgr2b^{-/-} y el Día 16 para ratones Fcer1g^{-/-}

^d Número de animales en un grupo con una medida del volumen tumoral registrada como cero al final del estudio.

Tabla 11-7 Grupos de Tratamiento y Porcentaje de TGI el Día 20 y Número de Respondedores Completos en el Modelo de Ratón Singeneico MCA205

Grupo ^a	Ensayo/Artículo del control	Dosis ^b (mg/kg)	Cepa de Ratón	% TG I ^c	Número de respondedores completos de 8 ratones ^d
1	Ninguno	NA	C57BL/6 Fcgr2b ^{-/-}	NA	0
2	Isotipo del control	7.5 mg/kg		NA	0
3	OX86 mIgG2a	7.5 mg/kg		95	8
4	Ninguno	NA	C57BL/6 Fcer1g ^{-/-}	NA	0
5	Isotipo del control	7.5 mg/kg		NA	0
6	OX86 mIgG2a	7.5 mg/kg		35	1

TGI = inhibición del crecimiento tumoral; NA = no aplicable; IP = intraperitoneal; V = volumen

^a Número de animales por grupo: 8.

^b Todos los animales recibieron 200 μ l de artículo de
5 ensayo IP los días 4 y 7.

^c % TGI = $[1 - (V \text{ tumoral medio del grupo de tratamiento}) \div (V \text{ tumoral medio del grupo de control})] \times 100$

^d Número de animales en un grupo con una medida del volumen tumoral registrada como cero al final del estudio.

10 En estudios farmacodinámicos paralelos, el tratamiento con OX86 mIgG2a, comparado con artículos de control, provocó un incremento significativo en el porcentaje de células T CD4+ Ki67+ en el bazo (Figura 39A) y células T CD8+ Ki67+ en la sangre periférica y el bazo, pero no en el tumor (Figura
15 40A) de ratones Balb/c Fcgr2b^{-/-} portadores de tumores CT26. No se detectó un incremento en células T CD4+ o CD8+ Ki67+ en la sangre, el bazo o el tumor de ratones Balb/c Fcgr1g^{-/-} portadores de tumores CT26 tras el tratamiento con OX86 mIgG2a, en comparación con artículos control (Figura 39B;
20 Figura 40B).

Adicionalmente, en estudios paralelos, el tratamiento con OX86 mIgG2a comparado con artículos control resultó en un incremento significativo en el porcentaje de células T CD4+ Ki67+ en el ganglio linfático de drenaje, bazo y tumor
25 (Figura 41A) y de células T CD8+ Ki67+ en el ganglio linfático de drenaje y el bazo (Figura 42A) de ratones C57BL/6 Fcgr2b^{-/-} portadores de tumores MCA205. Incrementos en el porcentaje de células T CD8+ Ki67+ en el tumor de ratones C57BL/6 Fcgr2b^{-/-} portadores de tumores MCA205 no
30 eran estadísticamente significativos (Figura 42A). El tratamiento con OX86 mIgG2a comparado con artículos control

indujo también un incremento significativo en el porcentaje de células T CD4+ Ki67+ en el ganglio linfático de drenaje y el bazo de ratones C57BL/6 Fcγ1g^{-/-} portadores de tumores MCA205 (Figura 41B). También se observó un incremento
5 significativo en el porcentaje de células T CD8+ Ki67+ en el bazo de estos ratones (Figura 42B). No se detectaron incrementos significativos en el porcentaje de células T CD4+ Ki67+ en el tumor (Figura 42B) o células T CD8+ Ki67+ en el ganglio linfático de drenaje o tumor de ratones C57BL/6
10 Fcγ2b^{-/-} portadores de tumores MCA205 (Figura 42B).

11.3 CONCLUSIONES

Una dosis única de OX86 mIgG2a en ratones naif indujo un incremento transitorio en la activación de células T y una proliferación tal como se mide por una expresión
15 incrementada de ICOS y Ki67, respectivamente. Se encontró una correlación lineal significativa del porcentaje de ICOS y Ki67 en células T CD4+ y CD8+. La actividad antitumoral de OX86 mIgG2a, medida como inhibición del crecimiento de tumores CT26 y MCA205, dependía de la expresión de receptores
20 Fcγ I, III y IV activantes, pero no del receptor Fcγ IIB inhibidor. Se observaron incrementos en la proliferación de células T (Ki67) de la sangre periférica, ganglio linfático de drenaje y/o bazo en experimentos farmacodinámicos paralelos en ratones portadores de tumores que expresaban
25 los receptores Fcγ activantes; se observó alguna proliferación de células T en ratones que expresaban solamente el receptor Fcγ inhibidor. Junto con los resultados farmacodinámicos de ratones naif, y aunque no se desea estar
30 ligado por la teoría, un mecanismo potencial para la actividad antitumoral de OX86 mIgG2a es una proliferación incrementada de células T (Ki67) periférica e intratumoral.

Además de ello, la actividad antitumoral de OX86 mIgG2a *in vivo* se produce tras la expresión de receptores Fcγ activantes.

5 EJEMPLO 12: Cambios Farmacodinámicos de Células T en Respuesta a la Terapia con OX40mAb24 en Ratones Inmunocomprometidos a los que se Injertaron Células Madre Hematopoyéticas Humanas

Este ejemplo investiga se OX40mAb24 puede activar y expandir células T de la memoria CD4+ y CD8+ humanas o
10 reducir Tregs humanos en ratones inmunocomprometidos con un sistema inmune humano reconstituido. OX40mAb24 se sometió a ensayo en un sistema con modelos de ratón *in vivo* reconstituido con células inmunes humanas para determinar si el fármaco tiene efectos inmunomoduladores sobre células T
15 humanas.

12.1 MATERIALES Y MÉTODOS

12.1.1 Animales de Ensayo

Ratones Nod.Cg-*Prkdc*^{scid}*Il2rg*^{tm1Wj}/SzJ (NSG) (n=14, edades 23-26 semanas) se obtuvieron de Jackson Laboratory. Los
20 animales se trataron humanamente y se alojaron de acuerdo con los protocolos del Institutional Animal Care and Use Committee en la instalación del Laboratory Animal Resources en MedImmune, una instalación autorizada por la Association for Animal Accreditation of Laboratory Animal Care y el
25 departamento de agricultura de Estados Unidos. Los animales se mantuvieron en unidades de microaislamiento estériles, provistos de cama y alimento, y agua de bebida acidificada a voluntad. Las condiciones ambientales fueron las normalizadas (temperatura ambiente: 20°C ± 1°C; humedad
30 relativa: 50% ± 10%; ciclo de luz-oscuridad 12 horas) Los

animales se vigilaron diariamente en cuanto a signos clínicos adversos durante el curso del estudio.

12.1.2 Farmacodinámica de OX40mAb24 en Ratones Injertados con HSC (Humanizados)

5 12.1.2.1 Establecimiento de Ratones Injertados con HSC Humano

Ratones injertados con HSC CD34+ humano se adquirieron de Jackson Laboratory. Los ratones se generaron como sigue: células CD34+ humanas agrupadas de múltiples donantes de
10 sangre del cordón umbilical se aislaron y se inyectaron por vía intravenosa en la vena de la cola de ratones Nod.Cg-*Prkdc*^{scid112rg^{tm1Wj}}/SzJ (NSG). A las 12 semanas después del injerto, se tomaron muestras de la sangre periférica de los ratones y se lisaron con tampón de lisis de glóbulos rojos
15 Pharm Lyse y luego se analizaron mediante citometría de flujo en cuanto a células CD45, CD19 y CD3 positivas humanas para determinar el grado de injerto de células inmunes humanas en los ratones. Ratones injertados con éxito con 25% o más células inmunes humanas CD45+ de los glóbulos rojos viables
20 totales fueron subsiguientemente transportados a MedImmune.

12.1.2.2 Enfrentamiento al Antígeno y Tratamiento con OX40mAb24 de ratones injertados con HSC humanas

El injerto sostenido de células inmunes humanas en ratones NSG fue confirmado mediante citometría de flujo a
25 las 22 semanas post-inyección de células CD34 humanas, y a las 23 semanas los ratones fueron dispuestos en 3 grupos que se dejaron sin tocar o recibieron tratamiento (Tabla 12-1). No hubo diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje medio de injerto de células CD45+ humanas entre
30 los grupos de tratamiento finales en la semana 22 antes del comienzo del experimento. El Grupo 1 consistía en 4 ratones

y no recibió inmunización subcutánea (SC) de hemocianina de lamprea bocallave (KLH) ni administración de anticuerpos. El Grupo 2 consistía en 5 ratones y recibió 300 µg/50 µL de KLH y 50 µL de adyuvante completo de Freund (CFA) en dos sitios de inyección SC independientes. Este grupo de ratones recibió también 2 mg/kg de anticuerpo control de isotipo hIgG1, administrados por vía intraperitoneal (IP), un día después de la inmunización con KLH. El Grupo 3 consistía en 5 ratones y recibió inmunización SC con KLH/CFA tal como se describe arriba. Además, a los ratones se les administró también un día más tarde una dosis única IP de 2 mg/kg de OX40mAb24. El día de la inmunización SC con KLH/CFA, antes de la inmunización (pre-tratamiento) y siete días más tarde (post-tratamiento), se obtuvo sangre entera a través de sangrado retro-orbital y las células se inmunofenotiparon y contaron mediante citometría de flujo.

Tabla 12-1 Grupos Experimentales, Injerto de Células CD45+ Humanas y Tratamiento

Grupo	Número de Ratón	Células CD45+ Humanas en forma de un Porcentaje de Células CD45 Humanas Más de Ratón Viables^a - Semana 22 post-injerto con HSC	Tratamiento^b - Semana 23 post-injerto con HSC
1	1-1 4575	39.5	Ninguno
1	1-2 4576	68.3	Ninguno

5			Células CD45+ Humanas en forma de un Porcentaje de Células CD45 Humanas Más de Ratón Viables^a - Semana 22	
10	Grupo	Número de Ratón	post- injerto con HSC	Tratamiento^b - Semana 23 post- injerto con HSC
	1	1-3 4577	20.9	Ninguno
	1	1-4 4578	23.8	Ninguno
15	2	2-1 4579	29.6	inmunización + con KLH NIP228 huIgG1
	2	2-2 4580	21.7	inmunización + con KLH NIP228 huIgG1
20	2	2-3 4581	27.8	inmunización + con KLH NIP228 huIgG1
	2	2-4 4582	50.3	inmunización + con KLH NIP228 huIgG1
25	2	2-5 4583	32.5	inmunización + con KLH NIP228 huIgG1
30	3	3-1 4584	15.4	inmunización + con KLH OX40mAb24

5

10

15

20

25

30

Grupo	Número de Ratón	Células CD45+ Humanas en forma de un Porcentaje de Células CD45 Humanas Más de Ratón Viables ^a - Semana 22 post-injerto con HSC	Tratamiento ^b - Semana 23 post-injerto con HSC
3	3-2 4585	44.3	inmunización + con KLH OX40mAb24
3	3-3 4586	20.3	inmunización + con KLH OX40mAb24
3	3-4 4587	16.3	inmunización + con KLH OX40mAb24
3	3-5 4588	25.6	inmunización + con KLH OX40mAb24

Hu = humano; KLH = hemocianina de lamprea bocallave; HSC = células madre hematopoyéticas.

^a Células CD45+ humanas determinadas por citometría de flujo; ^b inmunización con KLH, hemocianina de lamprea bocallave más adyuvante completo de Freund.

12.1.2.3 Análisis de Células Inmunes por Citometría de Flujo

Las células se inmunofenotiparon por citometría de flujo utilizando un protocolo de unión de anticuerpos de sangre entera. En síntesis, sangre entera anti-coagulada con EDTA a un volumen constante se añadió a pocillos de una placa de pocillos profundos y a las células se añadió una mezcla patrón de tinción de células T para unir los antígenos a las superficies de las células. Después de lavados en tampón FACS (PBS, pH 7.2 más suero de ternero recién nacido inactivado por calor al 2%), glóbulos rojos (RBC) se lisaron utilizando tampón de lisis 1X RBC, y las células se fijaron y permeabilizaron utilizando el kit EBiosciences Fix and Perm de acuerdo con el protocolo del fabricante. Posteriormente, mAbs anti-FoxP3 y anti-Ki67 se unieron a las células. Las células se lavaron utilizando tampón 1X fix and perm, se re-suspendieron en tampón FACS y los eventos se analizaron utilizando un citómetro de flujo LSRII. Los datos estándares de la citometría de flujo (FCS) brutos se analizaron utilizando el software FlowJo, y las poblaciones de células se identificaron después de la discriminación de células vivas/muertas y la separación de dobletes y desechos celulares. Después de sincronizar las poblaciones de células T CD4+ y CD8+, las células T de la memoria se determinaron mediante el perfil de expresión CD45RA y CCR7 con células T naif definidas como CD45RA+/CCR7+, células T efectoras (Teff) como CD45RA+/CCR7-, células T de la memoria efectoras (Tem) como CD45RA-/CCR7- y células T de la memoria central (Tcm) como CD45RA-/CCR7+. Las Tregs se definieron como células CD4+/FoxP3+.

12.1.2.4 Métodos estadísticos

Para representar gráficamente y analizar estadísticamente los datos se utilizó el software GraphPad Prism para Windows (versión 6.03).

5 Se utilizó el test de comparaciones múltiples ANOVA de una vía con análisis post-test de Turkey para comparar diferencias entre medias de grupo experimentales. En el caso de un test F significativo, se utilizó un test de comparaciones múltiples de Sidak. Un valor p menor que 0.05
10 se consideró significativo.

12.1.3 Materiales

Los materiales utilizados en este estudio, y su fuente, se relacionan en la Tabla 12-2.

Tabla 12-2

15	Elemento	Fuente
	CCR7 APC clon 150503 anti-humano	R&D Systems, Minneapolis, MN
	CD14 APC clon M5E2 anti-humano	Biolegend, San Diego, CA
	CD16 PE clon 1243 anti-humano	Biolegend, San Diego, CA
20	CD25 FITC clon M-A251 anti-humano	Biolegend, San Diego, CA
	CD3 FITC clon UCHT1 anti-humano	Biolegend, San Diego, CA
25	CD4 BV605 clon RPA-T4 anti-humano	Becton Dickinson, San Jose, CA
	CD56 FITC clon HCD56 anti-humano	Biolegend, San Diego, CA
	CD8 PE-CF594 clon RPA-T8 anti-humano	Becton Dickinson, San Jose, CA
30	CD19 APC clon HIB19 anti-humano	Biolegend, San Diego, CA

	Elemento	Fuente
5	CD19 PE-CF594 clon HIB19 anti-humano	Becton Dickinson, San Jose, CA
	CD45 PE clon HI30 anti-humano	Biolegend, San Diego, CA
	CD45 PE clon HI30 anti-humano	Biolegend, San Diego, CA
	FoxP3 PE clon PHC101 anti-humano	eBioscience, San Diego, CA
	HLA-DR BV421 clon 3G8 anti-humano	Biolegend, San Diego, CA
10	Ki67 FITC clon B56 anti-humano	Becton Dickinson, San Jose, CA
15	CD16/32 PE-Cy7 anti-ratón	Biolegend, San Diego, CA
	CD45 PE-Cy7 clon 30F11 anti-ratón	Biolegend, San Diego, CA
	Adyuvante completo de Freund (CFA) Difco™	Becton Dickinson, San Jose, CA
	Lit EBiosciences Fix and Perm	EBioscience, San Diego, CA
	Software FlowJo	FlowJo, Ashland, OR
20	Factor FoxP3/de Transcripción Concentrado y Diluyente de Fijación/Permeabilización	eBioscience, San Diego, CA
25	Software Graphpad Prism, v 6.03	Graphpad Software, San Diego, CA
	Suero de ternero fetal recién nacido inactivado por calor	Life Technologies, Frederick, MD
	Hemocianina de lamprea bocallave	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
30	Colorante Azul Fijable Live/Dead®	Life Technologies, Frederick, MD

	Elemento	Fuente
	Citómetro de flujo LSR II	BD Biosciences, San Jose, CA
5	Control de isotipo APC de IgG2a de ratón	eBioscience, San Diego, CA
	Control de isotipo BV421 de IgG2b de ratón	Biolegend, San Diego, CA
	Control de isotipo FITC de IgG1 de ratón	Biolegend, San Diego, CA
10	Solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7.2	Life Technologies, Frederick, MD
	Control de isotipo PE-CF594 de IgG1 de rata	Becton Dickinson, San Jose, CA
15	Control de isotipo PE de IgG2a de rata	eBioscience, San Diego, CA
	Control de isotipo PE-Cy7 de IgG2a de rata	Biolegend, San Diego, CA

12.2 RESULTADOS

Anticuerpo control OX40mAb24 o huIgG1 se administró un día después de la inmunización con KLH. OX40mAb24 dio como resultado una reducción estadísticamente significativa en el porcentaje de Treg en la sangre periférica después de seis días con relación al grupo al que se administró anticuerpo control de isotipo huIgG1 ($p = 0.019$, ANOVA de una vía; Figuras 43A y 43B). No se observaron diferencias en los porcentajes de Tregs entre grupos de tratamiento antes de la inmunización y administración de anticuerpos.

Además de una disminución significativa en el porcentaje de Tregs en la sangre periférica, había un incremento estadísticamente significativo en la relación Tem:Treg de CD4+ después de tratamiento con OX40mAb24 con

relación al control emparejado en isotipo huIgG1 ($p = 0.042$) y tendencias a incrementos significativos para relaciones totales CD4+:Treg ($p = 0.051$), CD4+ Teff:Treg ($p = 0.10$) y CD4+ Tem:Treg ($p = 0.069$) (Figuras 44A-D). Igualmente, se observó una tendencia a una significancia para un incremento en la relación CD8+ Teff:Treg ($p = 0.064$) en la sangre periférica de ratones tratados con OX40mAb24 con relación a la de ratones tratados con control de isotipo huIgG1 (Figuras 45A-B).

CD25 (receptor de IL-2) está supra-regulado en células T tras la activación y se considera un marcador de células T recientemente activadas. Incrementos en el porcentaje de células T CD8+ CD25 positivas se observaron para el grupo de tratamiento con OX40mAb24 con relación al grupo de tratamiento de huIgG1 para CD8+ totales ($p = 0.038$) CD8+ efectoras ($p = 0.076$) y para células T CD8+ de la memoria efectoras ($p = 0.040$) (Figuras 46A-C). Por lo tanto, el agonismo de OX40 por parte de OX40mAb24 activó células T CD8+ con relación al anticuerpo control.

12.3 CONCLUSIONES

En ratones injertados con células inmunes humanas, el tratamiento con OX40mAb24 tras la inmunización con antígenos resultó en células Treg periféricas disminuidas con respecto a ratones que recibieron anticuerpo control IgG1 humano. Igualmente, la relación de células T CD4+ totales, efectoras y de la memoria, y células T CD8+ efectoras con respecto a células Treg también se incrementó en la sangre periférica de ratones que recibieron OX40mAb24 en comparación con los que recibieron anticuerpo control huIgG1. Finalmente, el porcentaje de células T CD8+ que expresan CD25 en la superficie de la célula se incrementó después del tratamiento

con 0X40mAb24, indicando una inducción por 0X40 de la activación de células T CD8+ periféricas.

TABLA DE SECUENCIAS

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5	1 9B12 VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPD GTVKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSRTDYSLTITDLDQED IATYFCQQGSALPWTFGQGTKVEIK
10	2 LCDR1	RASQDISNYLN
	3 LCDR2	YTSKLHS
	4 LCDR3	QQGSALPWT
15	5 9B12 VH	EVQLQESGPSLVKPSQTLSTCSVTGDSFTSGYWNWIRKFP GNRLEYMGYISYNGITYHNPSLKSRIITRDTSKNHYYLQL NSVTTEDTATYFCARYRYDYDGGHAMDYWGQGTLLTVSS
	6 HFW1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCAVYGGSF
	7 Variante HFW1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCAVYGDSF
20	8 HCDR1	SGYWN
	9 HFW2-XXX	WIRX ₃₉ HPGKGLEX ₄₇ X ₄₈ G; en que X ₃₉ es Q o K, X ₄₇ es W o Y y X ₄₈ es I o M
	10 Variante HFW2	WIRQHPGKGLEWIG
25	11 Variante HFW2	WIRKHPGKGLEYMG
	12 Variante HFW2	WIRKHPGKGLEWIG
	13 Variante HFW2	WIRKHPGKGLEYIG
30	14 HCDR2	YISYNGITYHNPSLKS

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5	15 Variante HCDR2	YISYNAITYHNPSLKS
	16 Variante HCDR2	YISYSGITYHNPSLKS
10	17 HFW3-XXX	RITINX ₇₁ DTSKNQX ₇₈ SLQLNSVTPEDTAVYX ₉₁ CAR; , , en que X ₇₁ es P o R, X ₇₈ es F o Y y X ₉₁ es Y o F
	18 Variante HFW3	RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
15	19 Variante HFW3	RITINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYFCAR
	20 Variante HFW3	RITINRDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
	21 Variante HFW3	RITINRDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYFCAR
20	22 Variante HFW3	RITINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
	23 Variante HFW3	RITINPDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYFCAR
25	24 Variante HFW3	RITINPDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
	25 HCDR3	YRYDYDGGHAMDY
	26 Variante HCDR3	YKYDYDAGHAMDY
30	27 Variante HCDR3	YKYDYDGGHAMDY
	28 HFW4	WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5	29 OX40mAb VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPG KAPKLLIYYTSKLSHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPED FATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIK
10	30 Cadena ligera de OX40mAb	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPG KAPKLLIYYTSKLSHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPED FATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
15	31 ADN de cadena ligera de OX40MAB	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAG CGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGG ACATCAGCAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGC AAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTACACCAGCAAGCTGCA CAGCGGCGTGCCAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCA CCGACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGAC TTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGGCTCCGCCCTGCCCTG GACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGG TGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA TAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACA GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT ACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
30	32 OX40mAb VL - hu2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPG KAVKLLIYYTSKLSHSGVPSRFSGSGSRTDYTLTISSLQPED FATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5	33 OX40mAb5 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLTLTCAVYGGSFSSGYWNWIRQHP GKGLEWIGYISYNGITYHNPSLKSRLTINPDTSKNQFSLQL NSVTPEDTAVYYCARYRYDYDGGHAMDYWGQGTLLTVSS
10	34 OX40mAb5 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGGCA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGCAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCAGCTACAACGG CATCACCTACCACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCGGTACAGATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT 15 ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCTCT
	35 OX40mAb8 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLTLTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP GKGLEWIGYISYNGITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQFSLQL NSVTPEDTAVYYCARYRYDYDGGHAMDYWGQGTLLTVSS
20	36 OX40mAb8V H DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGGCA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCAGCTACAACGG CATCACCTACCACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA 25 TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCGGTACAGATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCTCT
30	37 OX40mAb13 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLTLTCAVYGDSFSSGYWNWIRKHP GKGLEVMGYISYNGITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQYSLQL NSVTPEDTAVYFCARYRYDYDGGHAMDYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5	38 OX40mAb13 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGACA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATGGGCTACATCAGCTACAACGG CATCACCTACCACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTTCTGCGC CCGGTACAGATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT ACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT
10	39 OX40mAb14 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGDSFSSGYWNWIRKHP GKGLEYGIGYISYNGITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQYSLQL NSVTPEDTAVYFCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS
15	40 OX40mAb14 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGACA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGG CATCACCTACCACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTTCTGCGC CCGGTACAGATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT ACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT
20	41 OX40mAb15 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGDSFSSGYWNWIRKHP GKGLEYGIGYISYNGITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQFSLQL NSVTPEDTAVYFCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS
25	42 OX40mAb15 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGACA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGG
30		

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5		CATCACCTACCACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTTCTGCGC CCGGTACAGATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCT
10	43 OX40mAb16 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGDSFSSGYWNWIRKHP GKGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQYSLQL NSVTPEDTAVYYCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS
15	44 OX40mAb16 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGACA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGG CATCACCTACCACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCGGTACAGATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT 20 ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCT
25	45 OX40mAb17 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGDSFSSGYWNWIRKHP GKGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQFSLQL NSVTPEDTAVYYCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS
30	46 OX40mAb VH17 DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGACA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGG CATCACCTACCACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5		CCGGTACAGATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCT
47	OX40mAb18 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLTLTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP GKGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRLTINPDTSKNQYSLQL NSVTPEDTAVYFCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS
10	48 OX40mAb18 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGGCA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGG CATCACCTACCACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTTCTGCGC CCGGTACAGATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCT
15		
20	49 OX40mAb19 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLTLTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP GKGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQYSLQL NSVTPEDTAVYFCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS
25	50 OX40mAb19 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGGCA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGG CATCACCTACCACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTTCTGCGC CCGGTACAGATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCT
30		

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5	51 OX40mAb20 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP GKGGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQYSLQL NSVTPEDTAVYYCARYRYDYDGGHAMDYWGQGTLVTVSS
10	52 OX40mAb20 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGGCA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGG CATCACCTACCACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCGGTACAGATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT 15 ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCT
20	53 OX40mAb21 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP GKGGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRLTINPDTSKNQYSLQL NSVTPEDTAVYYCARYRYDYDGGHAMDYWGQGTLVTVSS
25	54 OX40mAb21 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGGCA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGG CATCACCTACCACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCGGTACAGATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT 25 ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCT
30	55 OX40mAb22 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP GKGGLEYIGYISYNAITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQYSLQL NSVTPEDTAVYYCARYKYDYDAGHAMDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5	56 OX40mAb22 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGGCA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGC CATCACCTACCACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCGGTACAAATACGACTACGACGCCGGCCACGCCATGGACT ACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT
15	57 OX40mAb23 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP GKGLEYGIGYISYNAITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQYSLQL NSVTPEDTAVYYCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS
20	58 OX40mAb23 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGGCA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGC CATCACCTACCACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCGGTACAGATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT ACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT
25	59 OX40mAb24 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP GKGLEYGIGYISYNGITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQYSLQL NSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS
30	60 OX40mAb24 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGGCA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGG

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5		CATCACCTACCACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCGGTACAAATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCT
10	61 OX40mAb25 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLTLTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP GKGLEYIGYISYSGITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQYSLQL NSVTPEDTAVYYCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS
15	62 OX40mAb25 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGGCA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAGCGG CATCACCTACCACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCGGTACAGATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT 20 ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCT
25	63 OX40mAb25 a VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLTLTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP GKGLEYIGYISYSGITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQYSLQL NSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS
30	64 OX40mAb25 a VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGGCA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAGCGG CATCACCTACCACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5		CCGGTACAAATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCT
65	OX40mAb26 VH	EVQLQESGPSLVKPSQTLSTCSVTGDSFTSGYWNWIRKFP GNRLEYMGYISYNAITYHNPSLKSRIITRDTSKNHYLQL NSVTTEDTATYFCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLVTVSS
10	66 OX40mAb26 VH DNA	GAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCCAGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCAGCGTGACCGGCGACA GCTTCACCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGTTCCCC GGCAACCGGCTCGAGTACATGGGCTACATCAGCTACAACGC CATCACCTACCACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCAGCA 15 TCACCCGGGACACCAGCAAGAACCACTACTACCTGCAGCTG AACAGCGTGACCACCGAGGACACCGCCACCTACTTTTGCGC CCGGTACAGATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCT
20	67 OX40mAb27 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP GKGGLEYIGYISYNAITYHNPSLKSRIITNRDTSKNQYSLQL NSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGLVTVSS
25	68 OX40mA27 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGGCA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGC CATCACCTACCACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCGGTACAAATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT 30 ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCT

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5	69 Cadena CH de IgG1 humana	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
10		
15	ADN de cadena CH de IgG1 humana	GCgTCgACCAAGGGCCCATCcGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCCtGG AACTCAGGCGCtCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGC TGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG TGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCC CACCGTGCCCGAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC TTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTcTACA CCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC 30
70		AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5		CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCttaagCCTGTCTCCG GGTAAA
10	Cadena pesada de OX40mAb24	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP GKGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRITINRDTSKNQYSLQL NSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15		
20	71	
25	ADN de cadena pesada de OX40mAb24	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGGCA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGG CATCACCTACCACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCGGTACAAATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT ACTGGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCTGCgTCg ACCAAGGGCCCATCcGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA
30	72	

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5		AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTcCTGGAActCA GGCGctCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTcCT ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT TGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCACCGT 10 GCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA 15 CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTcTACACCCTGC CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG 20 ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAActACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA 25 ACCACTACACGCAGAAGAGCttaagCCTGTCTCCGGGTAAA
30	Cadena pesada de OX40mAb28	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP GKGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQYSLQL NSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCN 73 VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5		KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
10	ADN de cadena pesada de OX40mAb28	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGGCA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGG CATCACCTACCACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCGGTACAAATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT ACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCTGCGTCG ACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCTTGCAAGCAG AAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGA AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGC GGCGCTCTGACCAGCGCGTGCATACCTTCCCCGCCGTGCT CCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCG TGCCTTCCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAAC GTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT GGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCC CCGAGTTCTTGGGCGGACCTAGCGTGTTCTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGT GACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGG TCCAGTTTAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAAC GCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTA CAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGC
15		
20		
25		
30		
74		

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5		TGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGGC CTGCCTAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCCACCTAGCC AAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTG GTGAAAGGCTTCTATCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCC 10 CTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCCAGA CTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTT CAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG
15	Cadena pesada de OX40mAb29	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP GKGGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRITINRDTSKNQYSLQL NSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN 20 VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPASIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL 75 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	ADN de cadena pesada de OX40mAb29	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGGCA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGG CATCACCTACCACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATACCA 30 TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC
30		

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5		CCGGTACAAATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT ACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCTCTGCGTCG ACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCA GGCGCTCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCGGCTGTCTCT
10		ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT TGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATgcCCacCGT GCCCAGCACCTGAATTGAGGGGGGAcCGTCAGTCTTCCTC
15		TTCCCCCAAACCCaaGgACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC
20		AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTcTACACCCTGC CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTG
25		ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG
30		GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5	Cadena pesada de OX40mAb31	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP
10		GKGLEYGYSYNAITYHNPSLKSRITINRDTSKNQYSLQL
		NSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSSAS
		TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
		GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCN
		VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP
		KPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
		AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG
		LPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
		VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR
		LTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
15	ADN de cadena pesada de OX40mAb31	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC
20		CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGGCA
		GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC
		GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGC
		CATCACCTACCACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA
		TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTG
		AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC
		CCGGTACAAATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT
		ACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCTGCGTCG
25		ACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCTTGCAGCAG
		AAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGA
		AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACAGC
		GGCGCTCTGACCAGCGCGTGCATACCTTCCCCGCCGTGCT
		CCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCG
30		TGCCTTCCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAAC
		GTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT
		GGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCC

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5		CCGAGTTCCTGGGCGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGT GACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGG TCCAGTTTAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAAC GCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTA CAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGC
10		TGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGGC CTGCCTAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCCACCTAGCC AAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTG GTGAAAGGCTTCTATCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGA
15		GAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCC CTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCCAGA CTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTT CAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG
20	Cadena pesada de OX40mAb32	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP GKGLEYIGYISYNAITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQYSLQL NSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
25		VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
30	79	YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5	ADN de cadena pesada de OX40mAb32	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGGCA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGC CATCACCTACCACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCGGTACAAATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT ACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCTGCGTCG ACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCA GGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTCT ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT TGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATgcCCacCGT GCCCAGCACCTGAATTCGAGGGGGGAcCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCC AAAACCCaaGgACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAGCCCTCCCAGCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTcTACACCCTGC CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT
10		
15		
20		
25		
30		
80		

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5		GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
10	Cadena pesada de OX40mAb37	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP GKGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQYSLQL NSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGLVTVSSAK TTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNS GSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNV AHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPK DVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFDDDEVHTAQT QPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPA PIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITD FFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVN 81 QKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK
20	ADN de cadena pesada de OX40mAb37	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCC CAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTACGGCGGCA GCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCC GGCAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGG CATCACCTACCACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCA TCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTG AACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCGGTACAAATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACT ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCTGCGaaG ACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGC 30 TGCCCAAATAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCA 82 AGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAAGTCT

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5		GGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCT GCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCC CCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTT GCCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGT GCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACcGTCC CAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAG 10 GATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGT TGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCA GCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACG CAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGT CAGTGAAC TTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCA 15 AGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAA GGCTCCACAGGTGTATACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGA TGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGAC TTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGG 20 GCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACA CT CAGCCCATCATGG ACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTG CAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTACCTGCTC TGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGA GCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAA
25	Cadena ligera de OX40mAb37	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDISNYLNWYQQKPG KAPKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPED FATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIKRADAAPT VSI FPPSSE QLTSGGASVVCFLNNFY PKDINVKWKIDG SERQNGVLNSWT DQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPI 30 VKSFNRNEC
83		

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5	ADN de cadena ligera de OX40mAb37	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAG CGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCTGGGCCAGCCAGG ACATCAGCAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGC AAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTACACCAGCAAGCTGCA CAGCGGCGTGCCAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCA CCGACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGAC TTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGGCTCCGCCCTGCCCTG GACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGGCTG ATGCGGCGCCAAGTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAG CAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAA CAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTG ATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACT GATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCAC CCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCT ATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATT GTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT
20	VH de OX86	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTGYNLHWVRQPP GKGLEWMGRMRYDGDYYSVLSRLSISRDTSKNQVFLKM NSLQTDDTAIYYCTRDGRGDSFDYWGQGVMTVSS
25	Cadena pesada de OX86	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTGYNLHWVRQPP GKGLEWMGRMRYDGDYYSVLSRLSISRDTSKNQVFLKM NSLQTDDTAIYYCTRDGRGDSFDYWGQGVMTVSSASTTPP SVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLS SGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSETVTCNVAHPA SSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVL ITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPRE EQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEK TISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPE
30		

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5		DITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSN WEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK
10	ADN de cadena pesada de OX86	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGTCTGGTGCAGCC CTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGGTTCT CACTAACCGGTTACAATTTACACTGGGTTGCCAGCCTCCA GGAAAGGGTCTGGAGTGGATGGGAAGAATGAGGTATGATGG AGACACATATTATAATTCAGTTCTCAAATCCCGACTGAGCA TCAGCAGGGACACCTCCAAGAACCAAGTTTTCTTGAAAATG AACAGTCTGCAAACGGATGACACAGCCATTTACTATTGTAC CAGAGACGGGCGTGGTGACTCCTTTGATTACTGGGGCCAAG GAGTCATGGTCACAGTCTCCTCCGCGTCGACGACACCCCCA 15 TCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATAA CTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCC CTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCC AGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCT CTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCT 20 GGCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCC AGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGGGATTG TGGTTGTAAGCCTTGATATGTACCGTCCCAGAAGTATCAT CTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACC ATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACAT 25 CAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAG ATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAG GAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTTCC CATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAAT GCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCATCGAGAAA 30 ACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGT GTATACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATA
87		

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5		AAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAA GACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAATGGGCAGCCAGCGGA GAACTACAAGAACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCT CTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAAC TGGGAGGCAGGAAATACTTTACCTGCTCTGTGTTACATGA GGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACT CTCCTGGTAAA
10		
88	VL de OX86	DIVMTQGALPNPVPSGESASITCRSSQSLVYKDGQTYLNWF LQRPQGSPQLLTYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTYFTLKISR VRAEDAGVYYCQQVREYPFTFGSGTKLEIK
15	Cadena ligera de OX86	DIVMTQGALPNPVPSGESASITCRSSQSLVYKDGQTYLNWF LQRPQGSPQLLTYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTYFTLKISR VRAEDAGVYYCQQVREYPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIF PPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGV LNSWTDQDSKDYMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKT STSPIVKSFNRNEC
20		
25	ADN de cadena ligera de OX86	GATATTGTGATGACCCAGGGTGCACTCCCCAATCCTGTCCC TTCTGGAGAGTCAGCTTCCATCACCTGCAGGTCTAGTCAGA GTCTGGTATACAAAGACGGCCAGACATACTTGAATTGGTTT CTGCAGAGGCCAGGACAGTCTCCTCAGCTTCTGACCTATTG GATGTCTACCCGTGCATCAGGAGTCTCAGACAGGTTCAGTG GCAGTGGGTGAGGAACATATTTCACTGAAAATCAGTAGA GTGAGGGCTGAGGATGCGGGTGTGTATTACTGTCAGCAAGT TCGAGAGTATCCTTTCACTTTGCGCTCAGGGACGAAGTTGG AAATAAAACGGGCTGATGCGGCGCCAACTGTATCCATCTTC CCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGT CGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATG TCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTC
30		
90		

SEQ ID NO	Descripci ón	Secuencia
5		CTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTA CAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATG AACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACA TCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG T
10		MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDR CCHECRPGNGMVSRCRSRQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCK PCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGV DCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDA ICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTR PVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRL PPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI
15	91	OX40 humana
20	92	OX40 de ratón
		MYVWVQQPTALLLLGLTLGVTARRLNCVKHTYPSGHKCCRE CQPGHGMVSRCDHTRDTLCHPCETGFYNEAVNYDTCKQCTQ CNHRSGSELKQNCTPTQDTVCRCPGTQPRQDSGYKLGVC VPCPPGHFSPGNNQACKPWTNCTLSGKQTRHPASDSLDAVC EDRSLLATLLWETQRPTFRPTTVQSTTVWPRTSELPSPPTL VTPEGPAFAVLLGLGLGLLAPLTVLLALYLLRKAWRLPNT KPCWGNSFRTPIQEEHTDAHFTLAKI

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