

REIVINDICACIONES

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

- 5           1.    Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada (VH) humanizada y una región variable de cadena ligera (VL) humanizada;

              en donde VH comprende una secuencia de aminoácidos con  
10   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,  
15   HCDR3 es SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27, y HFW4 es SEQ ID NO: 28;

              en donde la VL comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 32; y

              en donde el anticuerpo o fragmento del mismo se puede  
20   unir específicamente a OX40 humana.

              2.    El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en donde la secuencia de aminoácidos de HFW2 es SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

25           3.    El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde 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.

30           4.    El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la VH

comprende 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, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 67.

5. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la VL comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 29, y la VH comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 59.

6. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende, además, una región constante de cadena ligera o fragmento de la misma condensada al extremo C de la VL.

7. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 6, en donde la región constante de la cadena ligera es una región constante kappa humana.

8. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende, además, una región constante de cadena pesada o fragmento de la misma condensada al extremo C de la VH.

9. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 8, en donde la región constante de la cadena pesada es una región constante de IgG1 humana, una región constante de IgG4P humana, una región constante de IgG1TM humana o una región constante de IgG1 murina.

10. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 9, en donde la región constante de la cadena pesada es una región constante de IgG1 humana.

11. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende 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.

12. El anticuerpo o fragmento del mismo de una  
5 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el fragmento de unión a antígenos es un fragmento Fv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fab', un fragmento dsFv, un fragmento scFv o un fragmento sc(Fv)<sub>2</sub>, o cualquier combinación de los mismos.

10 13. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que se puede unir específicamente a OX40 de mono cynomolgus o mono rhesus.

14. El anticuerpo o fragmento del mismo de la  
15 reivindicación 13, que se puede unir específicamente a OX40 tal como se expresa en células Jurkat, células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> activadas primarias de seres humanos mono cynomolgus, mono rhesus o cualquier combinación de las mismas.

15. El anticuerpo o fragmento del mismo de una  
20 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que no se une a OX40 murino o de rata.

16. El anticuerpo o fragmento del mismo de una  
cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que no reacciona de forma cruzada con proteínas de la Superfamilia del  
25 Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFRSF).

17. El anticuerpo o fragmento del mismo de la  
reivindicación 14, en donde la afinidad de unión por OX40 humano expresado en células T CD4<sup>+</sup> es de aproximadamente 250 pM a aproximadamente 370 pM según se mide por citometría de  
30 flujo.

18. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 17, en donde la afinidad de unión es aproximadamente 312 pM.

5 19. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 17 o la reivindicación 18, que puede conseguir una ocupación del receptor del 20% en células T CD4<sup>+</sup> humanas activadas primarias (CE<sub>20</sub>) a aproximadamente 63 hasta aproximadamente 93 pM, una ocupación del receptor del 50% en células T CD4<sup>+</sup> humanas activadas primarias (CE<sub>50</sub>) a  
10 aproximadamente 250 hasta aproximadamente 370 pM y una ocupación del receptor del 90% en células T CD4<sup>+</sup> humanas activadas primarias (CE<sub>90</sub>) a aproximadamente 2290 hasta aproximadamente 3330 pM según se mide por citometría de flujo.

15 20. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 19, en donde la CE<sub>20</sub> es aproximadamente 78 pM, la CE<sub>50</sub> es aproximadamente 312 pM y la CE<sub>90</sub> es aproximadamente 2810 pM.

21. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 14, en donde la afinidad de unión por OX40 humano expresado en células Jurkat que sobre-expresan OX40  
20 es de aproximadamente 250 pM a aproximadamente 600 pM según se mide por citometría de flujo.

22. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 21, en donde la afinidad de unión es  
25 aproximadamente 424 pM.

23. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 21 o la reivindicación 22, que puede conseguir una CE<sub>20</sub> en células Jurkat que sobre-expresan OX40 a aproximadamente 60 hasta aproximadamente 150 pM, una CE<sub>50</sub> en  
30 células Jurkat que sobre-expresan OX40 a aproximadamente 250 hasta aproximadamente 600 pM y una CE<sub>90</sub> en células Jurkat que

sobre-expresan OX40 a aproximadamente 2260 hasta aproximadamente 4380 pM según se mide por citometría de flujo.

24. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 23, en donde la  $CE_{20}$  es aproximadamente 106 pM, la  $CE_{50}$  es aproximadamente 424 pM y la  $CE_{90}$  es aproximadamente 3820 pM.

25. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 14, en donde la afinidad de unión por OX40 de mono cynomolgus expresado en células T  $CD4^+$  de mono cynomolgus activadas primarias es de aproximadamente 340 pM a aproximadamente 820 pM según se mide por citometría de flujo.

26. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 25, en donde la afinidad de unión es aproximadamente 580 pM.

27. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 14, en donde la afinidad de unión por OX40 de mono rhesus expresada en células T  $CD4^+$  de mono rhesus activadas primarias es de aproximadamente 130 pM a aproximadamente 600 pM según se mide por citometría de flujo.

28. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 27, en donde la afinidad de unión es aproximadamente 370 pM.

29. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, que 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  $CD4^+$  humanas activadas primarias en un ensayo basado en placa.

30. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 29, en donde se puede conseguir una respuesta

a la proliferación máxima del 20% (CE<sub>20</sub>) en células T CD4<sup>+</sup> 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% (CE<sub>50</sub>) en células T CD4<sup>+</sup> 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% (CE<sub>90</sub>) en células T CD4<sup>+</sup> humanas activadas primarias a una concentración del anticuerpo de aproximadamente 50 pM a aproximadamente 90 pM, todas según se mide por citometría de flujo.

31. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 30, en donde la CE<sub>20</sub> es aproximadamente 21 pM, la CE<sub>50</sub> es aproximadamente 28 pM y la CE<sub>90</sub> es aproximadamente 72 pM.

32. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31, en donde la citoquina es IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-5, IL-10, IL-2, IL-4, IL-13, IL-8, IL-12 p70, IL-1 $\beta$  o cualquier combinación de las mismas.

33. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 32, en donde la citoquina es IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-5, IL-10, IL-13, o cualquier combinación de las mismas.

34. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, que puede conseguir una proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y una liberación de citoquina en células T CD4<sup>+</sup> de mono cynomolgus activadas primarias y en células T CD4<sup>+</sup> de mono rhesus activadas primarias.

35. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, que puede activar

la vía de NF $\kappa$ B en células T que expresan OX40 en presencia de células que expresan Fc $\gamma$ R.

36. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 35, en donde las células T que expresan OX40 son células informadoras de NF $\kappa$ B-luciferasa Jurkat que expresan OX40, que producen luciferasa en respuesta a la estimulación de la vía de señalización de NF $\kappa$ B.

37. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, que puede desencadenar una citotoxicidad celular dependiente del complemento o dependiente del anticuerpo contra células que expresan OX40.

38. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 37, que puede unirse a C1q y desencadenar una citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo, mediada por NK, contra las células que expresan OX40.

39. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38, en donde la administración de una dosis eficaz a un sujeto en necesidad de tratamiento de cáncer puede inhibir el crecimiento del tumor en el sujeto.

40. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 39, en donde la inhibición del crecimiento del tumor se consigue en presencia de células T.

41. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 39 o la reivindicación 40, en donde 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.

42. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, y un soporte.

5 43. Un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, o una sub-unidad polipeptídica del anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41.

10 44. El polinucleótido de la reivindicación 43, 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.

45. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 43 o la reivindicación 44.

15 46. Una célula huésped que comprende el polinucleótido de la reivindicación 43 o la reivindicación 44 o el vector de la reivindicación 45.

20 47. Un método de producir un anticuerpo o fragmento del mismo, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 46 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.

25 48. Un método de supervivencia o proliferación de células T activadas, que comprende poner en contacto células T activadas con el anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se puede unir específicamente a OX40 sobre la superficie de las células T.

30 49. Un método de inducir la liberación de citoquinas a partir de células T activadas, que comprende poner en

contacto células T activadas con el anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se puede unir específicamente a OX40 sobre la superficie de las células T.

5        50. El método de la reivindicación 49, en el que la citoquina es IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-5, IL-10, IL-2, IL-4, IL-13, IL-8, IL-12 p70, IL-1 $\beta$ , o cualquier combinación de las mismas.

10        51. El método de la reivindicación 50, en el que la citoquina es IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-5, IL-10, IL-13, o cualquier combinación de las mismas.

52. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 48 a 51, en el que las células T activadas son células T CD4<sup>+</sup> activadas, células T CD8<sup>+</sup> activadas, o una combinación de las mismas.

15        53. El método de la reivindicación 52, en el que las células T CD4<sup>+</sup> activadas son células T CD4<sup>+</sup> humanas, células T CD4<sup>+</sup> de mono cynomolgus, células T CD4<sup>+</sup> de mono rhesus, o una combinación de las mismas.

20        54. Un método de fomentar la activación de células T, que comprende poner en contacto células T con el anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se puede unir específicamente a OX40 sobre la superficie de las células T.

25        55. El método de la reivindicación 54, en el que la activación de células T puede medirse mediante la estimulación de la vía de transducción de señales de NF $\kappa$ B.

30        56. El método de la reivindicación 54 o la reivindicación 55, en el que las células T son células T CD4<sup>+</sup> activadas, células T CD8<sup>+</sup> activadas, o una combinación de las mismas.

57. El método de la reivindicación 56, en el que las células T CD4<sup>+</sup> activadas son células T CD4<sup>+</sup> humanas, células T CD4<sup>+</sup> de mono cynomolgus, células T CD4<sup>+</sup> de mono rhesus, o una combinación de las mismas.

5 58. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 54 a 57, en el que la puesta en contacto comprende administrar una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento del mismo a un sujeto.

10 59. Un método de tratar el cáncer en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, o la composición de la reivindicación 42.

15 60. El método de la reivindicación 59, en el que el cáncer es un tumor sólido.

20 61. El método de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, en el que la administración del anticuerpo o fragmento del mismo o de la composición pueden inhibir el crecimiento del tumor, puede fomentar la reducción del tumor, o ambos.

62. El método de la reivindicación 61, en el que la inhibición del crecimiento del tumor se consigue en presencia de células T.

25 63. Un método de potenciar una respuesta inmune en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de la misma una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, o la composición de la reivindicación 42.

64. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 59 a 63, en el que el sujeto es un sujeto humano.

5 65. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, que se une a un epítipo de OX40 humano que cae dentro de los aminoácidos 108 a 146 de SEQ ID NO: 91.

10 66. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 65, en donde el epítipo comprende al menos los aminoácidos Leucina 116 y alanina 126 de SEQ ID NO: 91.

67. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, que se une a una variante de OX40 de ratón que comprende SEQ ID NO: 92, excepto por una mutación Q113L y una mutación V124A.

15 68. Un péptido aislado, que consiste en 100 o menos aminoácidos, en donde el péptido puede estar unido específicamente por el anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41.

20 69. El péptido de la reivindicación 68, que comprende los aminoácidos 116 a 126 de SEQ ID NO: 91.

25 70. El péptido de la reivindicación 68 o la reivindicación 69, que comprende 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.