

ANTICUERPOS ANTI-GITR Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOSCampo

La presente invención se relaciona con anticuerpos,
5 por ejemplo, anticuerpos de longitud completa que se unen a
la proteína relacionada con la familia receptora del factor
de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (GITR). La
invención además se relaciona con composiciones que
comprenden anticuerpos para GITR y métodos para utilizar los
10 anticuerpos anti-GITR como un medicamento. Ciertas
modalidades se relacionan con métodos para utilizar los
anticuerpos anti-GITR para el tratamiento, prevención y/o
diagnóstico de diversas enfermedades, incluyendo una
enfermedad hiperproliferativa, tal como cáncer.

15

Antecedentes

La proteína relacionada con la familia receptora
del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides
(GITR) se expresa en la superficie de las células NK y
20 células T, incluyendo células CD8⁺, CD4⁺, o T reguladoras
(Treg). Las Treg expresan GITR a mayores niveles que las
otras células T CD4⁺ o células T CD8⁺. La expresión de GITR es

baja y en poblaciones menores de Tregs en la sangre periférica, mientras que los tumores sólidos infiltrados por células Treg han incrementado la expresión de GITR en la mayoría de las Treg.

5 La vía de señalización de GITR incrementa la proliferación de células T y funciones efectoras y también protege las células T de la muerte celular inducida por la activación (AICD), la cual a su vez incrementa la frecuencia de la memoria de células T. Ver, por ejemplo, Ronchetti et al., Euro. J. of Immunology. 34(3):613-22 (2004); y Snell et al., Immunological Reviews. 244(1):197-217 (2011). Estudios previos han mostrado que un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-GITR agonista tiene una eficacia anti-tumor en múltiples modelos de tumor singénico de ratón, incluyendo Fibrosarcoma Meth A, carcinoma de colon CT26, y carcinoma de vejiga MB49. 15 Ver, por ejemplo, Joshi et al., Immunity, 43:1-12 (2015); y Ronchetti et al., J. of Immunology, 179:5916-5916 (2007). Se ha mostrado que esta eficacia corresponde con la sensibilidad intensificada de las células T efectoras. Ver, por ejemplo, 20 Ko et al., J. Exp. Med. 202(7):885-891 (2005); Coe et al., Cancer Immunol. Immunother., 59(9):1367-77 (2010); y Cohen et al., Cancer Res., 66(9):4904-12 (2006). Los agonistas de GITR

también han mostrado un efecto sinérgico anti-tumor con un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-PD-1. Ver, por ejemplo, Mitsui et al., Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer research, 16(10):2781-91 (2010); y Lu et al., J. of Translational Medicine, 12:36 (2014). En consecuencia, el desarrollo de un agente terapéutico a base de anticuerpos que modula la señalización de GITR podría ser de mayor valor en los tratamientos de cáncer.

10

Compendio

La invención descrita en la presente está dirigida a anticuerpos que se unen de forma selectiva a GITR. Se demostró que los anticuerpos anti-GITR de la presente invención tienen la doble propiedad de supresión de Treg y activación de las células T efectoras, lo cual a su vez resulta en una relación de T efectoras a Treg intensificada en tumores y regresión de tumor en pacientes.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a GITR y comprende: una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de complementariedad VH una

20

(CDR1), CDR2 VH y CDR3 VH de la VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 112; y/o una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una CDR1 VL, CDR2 VL y CDR3 VL de la VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 111. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región VH producida por el vector de expresión con No. de acceso de ATCC PTA-123632. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región VL producida por el vector de expresión con No. de acceso de ATCC PTA-123633.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una CDR1 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, 25, 26, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 41, 115, 116, 117, 63, 64, 65, una CDR2 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27, 28, 44, 45, 66 o 67 y una CDR3 VH que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 29, 46 o 68; y/o una CDR1 VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 21, 30, 36, 42, 113 o 31, una CDR2 VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22, 37, 43, 114 o 61 y una CDR3 VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en

SEQ ID NO: 23, 38 o 62. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 112 o una variante de la misma con una o varias sustituciones de aminoácidos conservadoras en los residuos que no están dentro de una CDR. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 111 o una variante de la misma con una o varias sustituciones de aminoácidos en los aminoácidos que no están dentro de una CDR. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 112 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 111.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a GITR y comprende: una VH que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH y CDR3 VH de la VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 16, 18, 20, 121 y 123; y/o una VL que comprende una CDR1 VL, CDR2 VL y CDR3 VL de la VL que tiene una secuencia de aminoácidos

seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 15, 17, 19, 120 y 122. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una CDR1 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50, 51, 52, 56 o 57, una CDR2 VH que comprende la
5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, 54, 58 o 59 y una CDR3 VH que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 55, 60 o 124; y/o una CDR1 VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 47, una CDR2 VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ
10 ID NO: 48 y una CDR3 VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 49.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a GITR y comprende: una VH que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH y CDR3
15 VH de la VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 70 y 72; y/o una VL que comprende una CDR1 VL, CDR2 VL y CDR3 VL de la VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 69 y 71. En algunas
20 modalidades, el anticuerpo comprende una CDR1 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, 76, 77, 84, 85 u 86, una CDR2 VH que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 78 o 79 y una CDR3 VH que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 80 u 87; y/o una CDR1 VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 73 u 81, una CDR2 VL que comprende la
5 secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 74 u 82 y una CDR3 VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 75 u 83.

En algunas modalidades, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo
10 quimérico. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante. En algunas modalidades, el anticuerpo es de la subclase de IgG₁, IgG₂, IgG_{2Δa}, IgG₃, IgG₄, IgG_{4Δb}, IgG_{4Δc},
15 IgG₄ S228P, IgG_{4Δb} S228P y IgG_{4Δc} S228P humanas. En algunas modalidades, el anticuerpo es del isotipo de IgG1.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a GITR y compete con y/o se une al mismo o se superpone con el epítipo
20 de GITR reconocido por los anticuerpos anti-GITR como se describen en la presente.

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-GITR proporcionado en la presente promueve la supresión de Treg y activa las células T efectoras (por ejemplo, cuando se miden *in vivo* utilizando un modelo de tumor singénico en las células CT26).

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-GITR proporcionado en la presente incrementa la liberación de las citocinas IFN γ y TNF α inflamatorias a partir de las células T efectoras (por ejemplo, cuando se miden *in vitro* en las células T CD4+ y CD8+).

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-GITR proporcionado en la presente intensifica las respuestas inmunes anti-tumorales (por ejemplo, al inhibir el crecimiento del tumor e intensificar los efectos sobre las células que no son T, tales como células NK y otras innatas).

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-GITR proporcionado en la presente se une a GITR humano.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-GITR como se describe en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-GITR como se describe en la presente. En otro aspecto, la invención
5 proporciona un vector que comprende el polinucleótido.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped aislada que produce de modo recombinante un anticuerpo anti-GITR como se describe en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método
10 para producir un anticuerpo anti-GITR, el método comprende: cultivar una línea celular que produce de modo recombinante el anticuerpo como se describe en la presente bajo condiciones en donde el anticuerpo se produce; y recuperar el anticuerpo.

15 En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo anti-GITR, el método comprende: cultivar una línea celular que comprende el ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID
20 NO: 110 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 109 bajo condiciones en donde el anticuerpo se produce; y recuperar el anticuerpo.

En algunas modalidades, las cadenas pesada y ligera se codifican en vectores separados. En otras modalidades, las cadenas pesada y ligera se codifican en el mismo vector.

En otro aspecto, la invención proporciona un método
5 para tratar un padecimiento en un sujeto que comprende administrar al sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de la composición farmacéutica como se describe en la presente. En algunas modalidades, el padecimiento es un cáncer. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del
10 grupo que consiste de cáncer relacionado con células B, cáncer gástrico, cáncer de intestino delgado, sarcoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer tímico, cáncer epitelial, cáncer salival, cáncer de hígado, cáncer biliar, tumores neuroendócrinos, cáncer de estómago, cáncer de tiroides,
15 cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer esofágico, cáncer pancreático, glioma, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer cervical, cáncer uterino, cáncer vulvar, cáncer penil, cáncer testicular, cáncer anal, coriocarcinoma, cáncer colorrectal,
20 cáncer oral, cáncer de piel, carcinoma de células de Merkel, glioblastoma, tumor cerebral, cáncer de hueso, cáncer ocular y melanoma.

En algunas modalidades, el cáncer relacionado con células B se selecciona del grupo que consiste de mieloma múltiple, neoplasma de células plasmáticas malignas, linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin predominante en linfocitos nodulares , enfermedad de Hahler y mielomatosis, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma, leucemia prolinfocítica de células B, leucemia de células pilosas, linfoma de no Hodgkin (NHL) de células B, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de zona marginal, linfoma de células de manto, linfoma de células grandes, linfoma linfoblástico de células B precursoras, leucemia mieloide, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de células B grandes difusas, linfoma folicular, linfoma de zona marginal, linfoma de tejido linfático asociado con la mucosa, linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma de células de manto, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes (tímico) mediastinal primario, linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma esplénico de zona marginal, linfoma intravascular de células B grandes , linfoma de efusión primaria,

granulomatosis linfomatoide, linfoma de células B grandes rico en células T/histiocitos, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma primario de células B grandes difusas cutáneas (tipo pierna), linfoma de células B grandes
5 difusas positivas a EBV de los adultos mayores, linfoma de células B grandes difusas asociado con inflamación, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de células B grandes positivas a ALK, linfoma plasmablastico, linfoma de células B grandes que surgen en la enfermedad Castleman
10 multicéntrica asociada a HHV8, linfoma de células B no clasificadas con características intermedias entre el linfoma de células B grandes difusas y el linfoma de Burkitt, linfoma de células B no clasificadas con características intermedias entre el linfoma de células B grandes difusas y el linfoma de
15 Hodgkin clásico y otro linfoma relacionado de células B.

En algunas modalidades, el cáncer es reincidente o refractario.

En algunas modalidades, el cáncer es localmente avanzado o melanoma metastásico, cáncer de cabeza y cuello de
20 células escamosas (SCHNC), cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer gástrico o cáncer de pulmón.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento o avance del tumor en un sujeto que tiene un tumor, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la composición farmacéutica como se describe en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir o prevenir la metástasis de células de cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de la composición farmacéutica como se describe en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para inducir la regresión del tumor en un sujeto que tiene un tumor que expresa GITR, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la composición farmacéutica como se describe en la presente.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la presente puede administrarse vía parenteral en un sujeto. En algunas modalidades, el sujeto es un humano.

En algunas modalidades, el método además puede comprender administrar una cantidad efectiva de un segundo agente terapéutico. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un agente bioterapéutico, por ejemplo, un

anticuerpo que incluye pero no se limita a un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-4-1BB, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-TIM3, un anticuerpo anti-LAG3, un anticuerpo anti-TIGIT, un anticuerpo anti-OX40, un anticuerpo de IL-8, un anticuerpo anti-HVEM, un anticuerpo anti-BTLA, un anticuerpo anti-CD40, un anticuerpo anti-CD40L, anticuerpo anti-CD47, un anticuerpo anti-CSF1R, un anticuerpo anti-CSF1, un anticuerpo anti-MARCO, anticuerpos anti-CXCR4, un anticuerpo anti-VEGFR1, un anticuerpo anti-VEGFR2, un anticuerpo anti-TNFR1, un anticuerpo anti-TNFR2, un anticuerpo biespecífico anti-CD3, un anticuerpo anti-CD19, un anti-CD20, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-ICOS, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD52, un anticuerpo anti-CCR4, un anticuerpo anti-CCR8, un anticuerpo anti-CD200R, un anticuerpo anti-VISG4, un anticuerpo anti-CCR2, un anticuerpo anti-LILRb2, un anticuerpo anti-CXCR4, un anticuerpo anti-CD206, un anticuerpo anti-CD163, un anticuerpo anti-KLRG1, un anticuerpo anti-FLT3, un anticuerpo anti-B7-H4, un anticuerpo anti-B7-H3 o un segundo anticuerpo anti-GITR.

En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un TNF α , un inhibidor PAP, un virus oncolítico, un inhibidor de cinasa, un inhibidor ALK (por ejemplo, sunitinib o crizotinib), un inhibidor MEK, un
5 inhibidor IDO, un inhibidor GLS1, un inhibidor de tirosina cinasa (por ejemplo, axitinib o palbociclib), una terapia de células T de CAR (Receptor de Antígeno Quimérico) o de células T, un agonista TLR (Receptor similar a Toll) (por ejemplo, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9) o una vacuna contra
10 tumor.

También se proporciona el uso de cualquiera de los anticuerpos anti-GITR proporcionados en la presente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer o para inhibir el crecimiento o avance de tumor en un sujeto en
15 necesidad del mismo.

Breve descripción de las figuras/dibujos

La Figura 1A representa un gráfico que resume la expresión de GITR en células T de sangre periférica humana, incluyendo las células reguladoras (Treg) CD4⁺ Foxp3⁺, las
20 células convencionales (Tconv) T CD4⁺Foxp3 y las células T CD8⁺ (CD8).

La Figura 1B representa un gráfico que resume la densidad (MFI) del anticuerpo anti-GITR (m3G7) de unión a las células positivas a GITR en Treg, células CD8 y células Tconv.

5 La Figura 1C representa un gráfico que resume la frecuencia de Treg, Tconv y células CD8 en células mononucleares de sangre periférica humana.

La Figura 2A representa un gráfico que resume la expresión de GITR y OX40 por las células T asociadas al
10 carcinoma de células renales, incluyendo las células T reguladoras (Tregs) CD4+ Foxp3+, las células T convencionales (Tconv) CD4+Foxp3 y las células T CD8+ (CD8).

La Figura 2B representa un gráfico que resume la densidad de unión (MFI) al anticuerpo GITR y OX40 en
15 subconjuntos de células T asociadas con RCC.

La Figura 2C representa un gráfico que resume la frecuencia de Treg, Tconv y células CD8 dentro del infiltrado inmune (CD45+) en tejidos de carcinoma de células renales.

La Figura 3A muestra un gráfico que resume los
20 anticuerpos anti-GITR m3G7 y la unión m10H2 a las células T activadas.

La Figura 3B muestra un gráfico que resume la unión de los anticuerpos anti-GITR R5 (h3G7 R5), R9 (h3G7 N9), R13 (10H2 N13) y R14 (10H2 N14) a las Treg activadas.

La Figura 4A muestra que los anticuerpos de GITR median la citotoxicidad celular en el ensayo *in vitro* de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) mediada por PBMC no fraccionadas. Los anticuerpos hIgG1 de GITR (m3G7 y m10H2) permiten que los macrófagos medien un exterminio dependiente de la dosis de las células T de GITR+.

La Figura 4B muestra que los anticuerpos de GITR median la citotoxicidad celular en el ensayo *in vitro* de la fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP) mediada por macrófagos. Los anticuerpos hIgG1 de GITR representados son h3G7 R5 ("R5"), h3G7 R9 ("R9"), h10H2 R13 ("R13") y h10H2 R14 ("R14").

La Figura 4C muestra que los anticuerpos de GITR median la citotoxicidad celular en el ensayo *in vitro* de fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP) mediada por macrófagos.

La Figura 5A muestra un gráfico que resume que los anticuerpos de GITR de la presente invención (h3G7 R5 ("R5"), h3G7 R9 ("R9"), h10H2 R13 ("R13") y h10H2 R14 ("R14"))

provocan una secreción intensificada de $\text{TNF}\alpha$ a partir de las células 3A9 GITR+ de una manera dependiente de la dosis cuando se une la placa.

La Figura 5B también muestra un gráfico que resume
5 que los anticuerpos anti-GITR R5, R9, R13 y R14 solubles intensificaron la secreción de $\text{TNF}\alpha$ entre las células 3A9 GITR+ co-cultivadas con la línea de linfoma de células B (LK35.2).

La Figura 5C muestra que los anticuerpos anti-GITR
10 R5, R9, R13 y R14 unidos a la placa provocaron incrementos dependientes de la dosis en $\text{IFN}\gamma$ secretado a partir de células T CD4+ y CD8+ de sangre humana activadas con el anticuerpo anti-CD3.

La Figura 5D muestra que los anticuerpos anti-GITR
15 R5, R9, R13 y R14 unidos a la placa provocaron incrementos dependientes de la dosis en $\text{TNF}\alpha$ secretado a partir de células T CD4+ y CD8+ de sangre humana activadas con el anticuerpo anti-CD3.

La Figura 6A, Figura 6B y Figura 6C muestran una
20 densidad correlacionada de la tinción de las líneas de células T que (A) no expresan, (B) que expresan bajo y (C)

que expresan alto GITR humano con el anticuerpo m10H2 anti-GITR.

La Figura 6D muestra la tinción de la citometría de flujo del anticuerpo m10H2 anti-GITR de las líneas celulares que no expresan, que expresan bajo y alto GITR descritas en la Figura 6A.

La Figura 6E muestra la PCR cuantitativa y normalización para la expresión de actina B de las líneas de células T que no expresan, expresan bajo y alto GITR humano.

La Figura 6F muestra la tinción con FFPE (embebida en parafina y fijada con formalina) de los tejidos aislados de tumores NSCLC con m10H2.

La Figura 6G muestra la tinción de FFPE de los tejidos aislados de los tumores NSCLC con el isotipo de control de anticuerpo de ratón.

La Figura 7A-Figura 7D muestran el crecimiento de tumor de ratones individuales tratados con 5mpk (mg/kg) del isotipo de control mIgG2a, 0.2, 1 y 5 mpk (mg/kg) de IgG2a Fc de 21B6 anti-GITR de ratón (m), respectivamente.

La Figura 7E-Figura 7H muestran el crecimiento de tumor de los ratones individuales tratados con 5 mpk (mg/kg)

del isotipo de control mIgG21, 0.2, 1 and 5 mpk (mg/kg) de IgG1 Fc 21B6 anti-GITR de ratón (m), respectivamente.

La Figura 7I muestra que el tratamiento con IgG1 no mejoró la supervivencia de los ratones que portaron el tumor comparado con los ratones tratados con el isotipo de control, 5 mientras que el tratamiento con IgG2a resultó en 40%, 44.4% y 80% de supervivencia con 0.2 mpk, 1 mpk y 5 mpk, respectivamente.

La Figura 7J muestra que la inhibición del 10 crecimiento de tumor mediado por mIgG2a de 21B6 se correlacionó con un incremento en la relación de células T CD8+: relación de Treg a una dosis de 1 mg/kg.

La Figura 7K muestra que la inhibición del crecimiento de tumor mediado por mIgG2a de 21B6 se 15 correlacionó con un incremento en la relación de células Teff CD4+: relación de Treg en todas las dosis.

La Figura 7L, Figura 7M y Figura 7N muestran que los ratones tratados con mIgG2a de 21B6 no tuvieron una reducción significativa en la cantidad de Treg infiltradas en 20 el tumor, mientras que las células T CD8+ y células Teff CD4+ no se afectaron.

La Figura 7O muestra que todas las dosis de mIgG2a de 21B6 redujeron la proporción de Tregs dentro de las células inmunes CD45+ que infiltran los tumores y que la proporción de Treg en el infiltrado inmune no se afectaron por el tratamiento de mIgG1 de 21B6.

La Figura 7P y la Figura 7Q muestran que los cambios en la proporción de células T CD8+ y células Teff CD4+ en el infiltrado de tumor no fueron significativas.

La Figura 7R, Figura 7S y Figura 7T muestran que los ratones tratados con 21B6 de mIgG2a tuvieron la mayor reducción de las proporciones de las Treg y Teff CD4+ en el bazo cuando se trataron con la dosis de 0.2 mg/kg (Figura 7R y Figura 7T) y que los cambios a otras dosis no fueron significativos. Las células T CD8+ esplénicas no se afectaron en ninguna dosis (Figura 7S).

Descripción Detallada

Se describen en la presente anticuerpos que se unen a GITR. Se proporcionan los métodos para elaborar anticuerpos anti-GITR, composiciones que comprenden estos anticuerpos y métodos para utilizar estos anticuerpos como un medicamento. Los anticuerpos anti-GITR pueden utilizarse para inhibir el

avance del tumor y pueden utilizarse en la prevención y/o tratamiento de cáncer y/u otras enfermedades. Se demuestra que los anticuerpos anti-GITR de la presente invención tienen al menos dos mecanismos para estimular la inmunidad anti-tumor que a su vez resulta en regresión del tumor. El primer mecanismo está dirigido hacia la supresión de las Treg que infiltran el tumor, lo cual lleva a una activación inmune local, en particular en la activación de las células T efectoras intensificadas. El segundo mecanismo es una intensificación directa de las funciones efectoras de las células T efectoras y supervivencia de las células CD8+ como un agonista de GITR. El efecto combinado de la supresión de Treg y la activación de las células T efectoras resulta en la relación de células T efectoras a Treg intensificada en tumores fríos y puede inducir la regresión de tumor, especialmente en pacientes que tienen una respuesta anti-tumor adaptativa existente.

Técnicas generales

A menos que se indique de otro modo, la práctica de la presente invención empleará técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes),

microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, las cuales están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura, tales como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second
5 edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and
10 Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths y D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C.
15 Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds.,
20 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach

(D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

Definiciones

A menos que se indique de otro modo, los siguientes términos deberán entenderse por tener los siguientes significados: el término "molécula aislada" se denomina como una molécula (donde la molécula, por ejemplo, es un polipéptido, un polinucleótido o un anticuerpo) que en virtud de su origen o fuente de derivación (1) no está asociado con componentes asociados de modo natural que se acompañan en su estado nativo, (2) está sustancialmente libre de otras moléculas de la misma fuente, por ejemplo, especies, células de las cuales se expresa, biblioteca, etc., (3) se expresa por una célula a partir de una especie diferente o (4) no es de origen natural. De este modo, una molécula que se sintetiza o expresa químicamente en un sistema celular diferente del sistema del cual se origina naturalmente se

"aislará" de sus componentes asociados de forma natural. Una molécula también puede reproducirse sustancialmente libre de componentes asociados de forma natural por aislamiento, utilizando técnicas de purificación bien conocidas en el arte. La pureza y homogeneidad de la molécula puede evaluarse por un número de medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la pureza de una muestra de polipéptidos puede evaluarse utilizando electroforesis de gel de poliacrilamida y la tinción del gel para visualizar el polipéptido utilizando técnicas bien conocidas en el arte. Para ciertos propósitos, puede proporcionarse una mayor resolución al utilizar HPLC o u otros medios bien conocidos en la técnica para purificación.

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de especificar la unión a un objetivo, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento del antígeno, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se utiliza en la presente y a menos que se indique de otro modo, el término no solo abarca anticuerpos policlonales o monoclonales sino también cualquier porción de unión al antígeno del mismo que compita

con el anticuerpo intacto por la unión específica, proteínas de fusión que comprendan una porción de unión al antígeno y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento del antígeno. Las porciones de unión al antígeno incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, anticuerpos de dominio (dAbs, por ejemplo, anticuerpos de tiburón y camélido), fragmentos que incluyen regiones determinantes de la complementariedad (CDR), anticuerpos de fragmento de cadena variable sencilla (scFv), maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv y polipéptidos que contienen al menos una porción de inmunoglobulina que es suficiente para conferir la unión de antígeno específica en el polipéptido. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o subclase del mismo) y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la región constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas además pueden dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo,

IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de la subunidad y
5 configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de cadena ligera del anticuerpo o la región variable de cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola
10 o en combinación. Como se conoce en la técnica, cada una de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera consiste de cuatro regiones de marco (FR) conectadas por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables y contribuyen a la
15 formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Si se desean variantes de una región variable objeto, en particular con la sustitución de residuos de aminoácidos fuera de una región CDR (es decir, en la región de marco), la sustitución de aminoácidos apropiada, de preferencia,
20 sustitución de aminoácidos conservadora, puede identificarse al comparar la región variable objeto con las regiones variables de otros anticuerpos que contienen secuencias CDR1

y CDR2 de la misma clase canónica como la región variable objeto (Chothia y Lesk, J Mol Biol 196(4): 901-917, 1987).

En ciertas modalidades, la delineación definitiva de una CDR e identificación de residuos que comprenden el
5 sitio de unión de un anticuerpo se logra al resolver la estructura del anticuerpo y/o resolver la estructura del complejo anticuerpo-ligando. En ciertas modalidades que pueden lograrse por cualquiera de una variedad de técnicas conocidas por aquellos con experiencia en el arte, tales como
10 cristalografía de rayos X. En ciertas modalidades, pueden emplearse diversos métodos de análisis para identificar o aproximar las regiones de CDR. En ciertas modalidades, pueden emplearse diversos métodos de análisis para identificar o aproximar las regiones de CDR. Ejemplos de tales métodos
15 incluyen, pero no se limitan a la definición de Kabat, la definición de Chothia, la definición de AbM, la definición de contacto y la definición conformacional.

La definición de Kabat es un estándar para numerar los residuos de un anticuerpo y normalmente se utiliza para
20 identificar las regiones de CDR. Ver, por ejemplo, Johnson y WO, 2000, Nucleic Acids Res., 28: 214-8. La definición de Chothia es similar a la definición de Kabat, pero la

definición de Chothia toma en cuenta las posiciones de ciertas regiones de bucle estructural. Ver, por ejemplo, Chothia et al., 1986, J. Mol. Biol., 196: 901-17; Chothia et al., 1989, Nature, 342: 877-83. La definición de AbM utiliza
5 un paquete integrado de programas de cómputo producidos por Oxford Molecular Group que modela la estructura del anticuerpo. Véase, por ejemplo, Martin et al., 1989, Proc Natl Acad Sci (USA), 86:9268-9272; "AbM™, A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies," Oxford, UK;
10 Oxford Molecular, Ltd. La definición de AbM modela la estructura terciaria de un anticuerpo a partir de la secuencia principal utilizando una combinación de bases de datos conocidas y los métodos de inicio de ab, tales como aquellos descritos por Samudrala et al., 1999, "Ab Initio
15 Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach," en PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl., 3:194-198. La definición de contacto se basa en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Ver, por ejemplo, MacCallum et al., 1996, J.
20 Mol. Biol., 5:732-45. En otro procedimiento denominado en la presente como la "definición conformacional" de las CDR, las posiciones de las CDR pueden identificarse como los residuos

que hacen contribuciones entálpicas a una unión al antígeno. Ver, por ejemplo, Makabe et al., 2008, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166. Incluso otras definiciones limitantes de las CDR pueden no seguir de forma estricta uno
5 de los procedimientos anteriores, pero, sin embargo, se traslapará con al menos una porción de las CDR de Kabat, aunque puedan acortarse o alargarse en vista de la predicción o hallazgos experimentales de esos residuos o grupos de residuos particulares que no impactan significativamente la
10 unión al antígeno. Como se utiliza en la presente, una CDR puede referirse a CDR definidas por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo combinaciones de procedimientos. Los métodos utilizados en la presente pueden utilizar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos
15 procedimientos. Para cualquier modalidad dada que contenga más de una CDR, las CDR pueden definirse de acuerdo con cualquiera de las definiciones de Kabat, Chothia, extendido, AbM, de contacto, y/o conformacional.

Como se conoce en la técnica, una "región
20 constante" de un anticuerpo se refiere a la región constante de cadena ligera del anticuerpo o a la región constante de cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola o en combinación.

Como se utiliza en la presente, el "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos contra un sitio antigénico simple. Además, en contraste con las preparaciones del anticuerpo policlonal que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra una determinante simple en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo cuando se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere de la producción del anticuerpo por algún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizan de acuerdo con la presente invención pueden elaborarse mediante el método del hibridoma descrito en primer lugar por Kohler y Milstein, 1975, Nature 256:495 o pueden elaborarse mediante métodos de ADN recombinante tales

como se describen en la Patente de los EE. UU. No. 4,816,567. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse a partir de bibliotecas de fagos generadas utilizando las técnicas descritas, por ejemplo, en McCafferty et al., 1990, Nature 5 348:552-554. Como se utiliza en la presente, anticuerpo "humanizado" se refiere a las formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murino) que son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas o fragmentos de inmunoglobulina de los mismos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras 10 subsecuencias de unión al antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. De preferencia, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una CDR del receptor se reemplazan por 15 residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. El anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o marco 20 importadas, pero se incluyen para refinar y optimizar aún más el desempeño del anticuerpo.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde con la de un anticuerpo producido por un humano y/o se ha elaborado utilizando cualquiera de las técnicas para elaborar los anticuerpos humanos como se describe en la presente. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos.

El término "anticuerpo quimérico" pretende referirse a anticuerpos en los cuales las secuencias de región variable se derivan de una especie y las secuencias de región constante se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el cual las secuencias de región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de región constante se derivan de un anticuerpo humano.

El término "epítipo" se refiere a la porción de una molécula capaz de reconocerse por y unirse mediante un anticuerpo a una o más regiones de unión al antígeno del anticuerpo. Los epítipos a menudo consisten de un agrupamiento en superficie de moléculas tales como cadenas laterales de aminoácidos o azúcares y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como las

características de carga específica. En algunas modalidades, el epítopo puede ser un epítopo de proteína. Los epítopos de proteína pueden ser lineales o conformacionales. En un epítopo lineal, todos los puntos de interacción entre la

5 proteína y la molécula que interactúa (tal como un anticuerpo) ocurre linealmente a lo largo de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína. Un "epítopo no lineal" o "epítopo conformacional" comprende polipéptidos (o aminoácidos) no contiguos dentro de la proteína antigénica a

10 la cual se une un anticuerpo específico al epítopo. Como se utiliza en la presente, el término "epítopo antigénico" se define como una porción de un antígeno en el cual un anticuerpo puede unirse específicamente cuando se determina por cualquier método bien conocido en la técnica, por

15 ejemplo, mediante inmunoensayos convencionales. Una vez que se determina el epítopo deseado sobre un antígeno, es posible generar anticuerpos de ese epítopo, por ejemplo, al utilizar las técnicas descritas en la presente especificación. De forma alternativa durante el proceso de descubrimiento, la

20 generación y caracterización de anticuerpos puede esclarecer información sobre los epítopos deseables. A partir de esta información entonces es posible seleccionar de forma

competitiva anticuerpos para unirlos al mismo epítopo. Un procedimiento para lograr esto es llevar a cabo estudios de competencia y competencia cruzada para encontrar anticuerpos que compitan o compitan de forma cruzada entre sí para unirse a GITR, por ejemplo, los anticuerpos compiten para unirse al antígeno.

Como se utiliza en la presente, el término "GITR" se refiere a cualquier forma de GITR y variantes del mismo que retienen al menos parte de la actividad de GITR. A menos que se indique de modo diferente, tal como mediante la referencia específica a GITR humano, GITR incluye todas las especies de mamíferos de la secuencia nativa de GITR, por ejemplo, humana, de canino, felino, equino y bovino. Un GITR humano ejemplar se encuentra como el Número de Acceso Uniprot Q9Y5U5 (SEQ ID NO: 108).

El término "agonista" se refiere a una sustancia que promueve (es decir, induce, provoca, intensifica o incrementa) la actividad biológica o efecto de otra molécula. El término agonista abarca sustancias que se unen al receptor, tales como un anticuerpo y sustancias que promueven la función del receptor sin unirse al mismo (por ejemplo, al activar una proteína asociada).

El término "anticuerpo antagonista" se refiere a un anticuerpo que se une a un objetivo y evita o reduce el efecto biológico de ese objetivo. En algunas modalidades, el término puede denotar un anticuerpo que evita que el objetivo
5 al cual se une realice una función biológica.

Los términos "polipéptido", "oligopéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan de modo intercambiable en la presente para referirse a cadenas de aminoácidos de cualquier longitud. La cadena puede ser lineal o ramificada,
10 puede comprender aminoácidos modificados y/o puede interrumpirse por componentes no aminoácidos. Los términos también abarcan una cadena de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación,
15 acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como la conjugación con un componente etiquetado. Por ejemplo, también se incluyen dentro de la definición polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no
20 naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entenderá que los polipéptidos pueden ocurrir como cadenas simples o cadenas asociadas.

Como se utiliza de modo intercambiable en la presente y como se utiliza en la técnica, "polinucleótido," o "ácido nucleico", se refieren a cadenas de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos
5 pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificadas y/o sus análogos o cualquier sustrato que pueda incorporarse en una cadena mediante la ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y
10 sus análogos. Si está presente, puede impartirse modificación a una estructura de nucleótidos antes o después del ensamblaje de la cadena. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes que no son nucleótidos. Un polinucleótido además puede modificarse después de la
15 polimerización, tal como mediante la conjugación con un componente etiquetado. Otro tipo de modificaciones incluyen, por ejemplo, "protegidos", sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleótidos tales como, por ejemplo, aquellos con
20 enlaces no cargados (por ejemplo, metil-fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos,

fosforoditioatos, etc.), aquellos que tienen porciones
pendientes tales como por ejemplo, proteínas (por ejemplo,
nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, poli-L-
lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo,
5 acridina, psoralen, etc.), aquellos que contienen quelantes
(por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales
oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquiladores,
aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos
nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no
10 modificadas de los polinucleótidos. Además, cualquiera de los
grupos hidroxilo presentes de modo ordinario en los azúcares
pueden reemplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato,
grupos fosfato, protegidos por grupos protectores estándar o
activados para preparar enlaces adicionales a los nucleótidos
15 adicionales o pueden conjugarse a soportes sólidos. El OH 5'
y 3' terminal puede fosforilarse o sustituirse con aminas o
porciones de grupos protectores orgánicos de 1 a 20 átomos de
carbono. Otros hidroxilos también pueden derivarse en grupos
protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden
20 contener formas análogas de azúcares de ribosa o
desoxirribosa que se conocen generalmente en la técnica,
incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil, 2'-fluoro- o

2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares alfa- o beta-anoméricos, azúcares epiméricos tales como azúcares de arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos
 5 acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metil-ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse mediante grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a modalidades en donde el fosfato se reemplaza por
 10 $P(O)S$ ("tioato"), $P(S)S$ ("ditioato"), $(O)NR_2$ ("amidato"), $P(O)R$, $P(O)OR'$, CO o CH_2 ("formacetal"), en el cual cada R o R' es independientemente H o alquilo (de 1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter ($-O-$), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo.
 15 No todos los enlaces de un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción precedente aplica a todos los polinucleótidos denominados en la presente, incluyendo ARN y ADN.

Un anticuerpo que se "une de preferencia" o se "une
 20 específicamente" (utilizados de modo intercambiable en la presente) a un epítipo es un término bien entendido en la técnica y métodos para determinar tal unión específica o

preferencial que también se conocen bien en la técnica. Se dice que una molécula muestra una "unión específica" o "unión preferencial" si reacciona o se asocia de modo más frecuente, más rápida, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia particular que cuando lo hace con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo se "une específicamente" o se "une de preferencia" a un objetivo si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que cuando se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une de forma específica o preferencial a un epítipo de GITR es un anticuerpo que une este epítipo con mayor afinidad, avidez, más rápidamente y/o con mayor duración que cuando se une a otros epítopos de GITR o epítopos sin GITR. También se entenderá al leer esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o porción o epítipo) que se une de forma específica o preferencial a un primer objetivo puede unirse o no de forma específica o preferencial a un segundo objetivo. Como tal, la "unión específica" o "unión preferencial" no necesariamente requiere (aunque puede incluir) de una unión exclusiva. En general, pero no necesariamente, la referencia a la unión significa la unión preferencial.

Como se utiliza en la presente, "sustancialmente puro" se refiere al material que al menos es 50% puro (es decir, libre de contaminantes), de mayor preferencia, al menos 90% puro, de mayor preferencia, al menos 95% puro, incluso de mayor preferencia, al menos 98% puro y de mayor preferencia, al menos 99% puro.

Una "célula huésped" incluye una célula individual o cultivo celular que es o ha sido un receptor de vectores para la incorporación de insertos de polinucleótidos. Las células huésped incluyen la progenie de una sola célula huésped y la progenie no necesariamente puede ser completamente idéntica (en morfología o en el complemento de ADN genómico) a la célula progenitora original debido a una mutación natural, accidental o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas *in vivo* con un polinucleótido de esta invención.

Como se conoce en la técnica, el término "región Fc" se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina. La "región Fc" puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada

de IgG humana normalmente se define para extenderla de un residuo de aminoácido en la posición Cys226 o de Pro230 al término carboxilo del mismo. La numeración de los residuos en la región Fc es aquella del índice EU como en Kabat. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. La región Fc de una inmunoglobulina comprende en general dos dominios constantes, CH2 y CH3. Como se conoce en la técnica, una región Fc puede estar presente en forma de dímero o monomérica.

Como se utiliza en la técnica, el "receptor Fc" y "FcR" describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. La FcR preferida es una secuencia nativa de FcR humana. Más aún, una FcR preferida es una que une un anticuerpo de IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de la activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. Las FcR se revisaron en Ravetch y Kinet, 1991,

Ann. Rev. Immunol., 9:457-92; Capel et al., 1994, Immunomethods, 4:25-34; y de Haas et al., 1995, J. Lab. Clin. Med., 126:330-41. "FcR" también incluye el receptor neonatal FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG
5 maternas al feto (Guyer et al., 1976, J. Immunol., 117:587; y Kim et al., 1994, J. Immunol., 24:249).

Como se utiliza en la presente, el término "competir" con respecto a un anticuerpo, significa que un primer anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo se
10 une a un epítipo de una manera suficientemente similar a la unión de un segundo anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo, de modo que el resultado de la unión del primer anticuerpo con su epítipo cognado pueda detectarse reducido en presencia del segundo anticuerpo comparado con la
15 unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa que puede, pero no necesariamente ser el caso es cuando la unión del segundo anticuerpo a su epítipo también puede detectarse reducido en presencia del primer anticuerpo. Es decir, un primer anticuerpo puede
20 inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítipo sin que el segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su epítipo respectivo. Sin embargo, cuando cada

anticuerpo inhibe de modo detectable la unión del otro anticuerpo con su epítopo o ligando cognado, si hace lo mismo en mayor o menor grado, se dice que los anticuerpos "compiten de forma cruzada" entre sí por la unión de sus epítopos
5 respectivos. Ambos anticuerpos con competencia y competencia cruzada se abarcan por la presente invención. En relación con el mecanismo por el cual ocurre tal competencia o competencia cruzada (por ejemplo, obstáculo estérico, cambio conformacional o unión a un epítopo o porción común del
10 mismo), el técnico experimentado podría apreciar con base en las enseñanzas proporcionadas en la presente, que se abarcan tales anticuerpos con competencia y/o competencia cruzada y pueden ser útiles para los métodos descritos en la presente.

Una "región Fc funcional" posee al menos una
15 función efectora de una región Fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" ejemplares incluyen la unión a Clq; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo; fagocitosis; desregulación de los receptores de
20 superficie celular (por ejemplo, receptor de células B), etc. Tales funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un

dominio variable de anticuerpo) y puede evaluarse utilizando diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar tales funciones efectoras del anticuerpo.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una
5 secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, incluso
10 retiene al menos una función efectora de la región Fc de la secuencia nativa. De preferencia, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos comparada con una región Fc de secuencia nativa a la región Fc de un polipéptido progenitor, por ejemplo, de aproximadamente uno a
15 aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos y de preferencia, de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido progenitor. La región Fc variante en la presente de preferencia posee al
20 menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido progenitor y de mayor preferencia, al menos

aproximadamente 90% de identidad de secuencia con el mismo, de mayor preferencia, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99% de
5 identidad de secuencia con el mismo.

Como se utiliza en la presente, "tratamiento" es un procedimiento para obtener resultados clínicos benéficos o deseados. Para propósitos de esta invención, los resultados clínicos benéficos o deseados incluyen, pero no se limitan a
10 uno o más de los siguientes: reducir (o destruir) la proliferación de células cancerígenas o neoplásicas, inhibir la metástasis de células neoplásicas, contracción o reducción del tamaño de un tumor, remisión de cáncer, reducción de los síntomas que resultan de cáncer, incremento de la calidad de
15 vida de los que sufren de cáncer, reducir la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar cáncer, retardar el avance de cáncer, curar un cáncer, y/o prolongar la supervivencia de los pacientes que tienen cáncer.

"Mejorar" significa una disminución o mejora de uno
20 o más síntomas cuando se comparan con no administrar un anticuerpo anti-GITR. "Mejorar" también incluye el acortamiento o reducción de la duración de un síntoma.

Como se utiliza en la presente, una "dosificación efectiva" o "cantidad efectiva" de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para efectuar cualquiera de uno o más resultados benéficos o
5 deseados. En aspectos más específicos, una cantidad efectiva evita, alivia o mejora los síntomas de la enfermedad y/o prolonga la supervivencia del sujeto que se está tratando. Para uso profiláctico, los resultados benéficos o deseados incluyen eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad
10 o retardar el inicio de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados benéficos o
15 deseados incluyen resultados clínicos tales como reducir uno o más síntomas de una enfermedad tal como, por ejemplo, cáncer incluyendo, por ejemplo sin limitación, cáncer relacionado con células B, cáncer gástrico, cáncer de intestino delgado, sarcoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer
20 tímico, cáncer epitelial, cáncer salival, cáncer de hígado, cáncer biliar, tumores neuroendócrinos, cáncer de estómago, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de

ovario, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer esofágico, cáncer pancreático, glioma, cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células renales), cáncer de vejiga, cáncer cervical, cáncer uterino, cáncer vulvar, cáncer penil, cáncer testicular, cáncer anal, coriocarcinoma, cáncer colorrectal, 5 cáncer oral, cáncer de piel, carcinoma de células de Merkel, glioblastoma, tumor cerebral, cáncer de hueso, cáncer ocular y melanoma, al reducir la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar la enfermedad, intensificando el efecto de otro medicamento y/o retardando el avance del 10 cáncer en pacientes. Una dosificación efectiva puede administrarse en una o más administraciones. Para propósitos de esta invención, una dosificación efectiva del fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad 15 suficiente para lograr un tratamiento profiláctico o terapéutico ya sea de forma directa o indirecta. Como se entiende en el contexto clínico, una dosificación efectiva de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o no lograrse junto con otro fármaco, compuesto o composición 20 farmacéutica. De este modo, una "dosificación efectiva" puede considerarse en el contexto de administrar uno o más agentes terapéuticos y puede considerarse un solo agente para darse

en una cantidad efectiva si junto con uno o más agentes diferentes puede ser o se logra un resultado deseable.

Un "individuo" o un "sujeto" es un mamífero, de mayor preferencia, un humano. Los mamíferos también incluyen, pero no se limitan a, animales de granja (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, pollos, etc.), animales para deportes, mascotas, primates, caballos, perros, gatos, ratones y ratas.

Como se utiliza en la presente, "vector" significa un constructo, el cual es capaz de administrar y de preferencia expresar uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, vectores de plásmidos, cósmidos o fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónica, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y ciertas células eucarióticas, tales como células productoras.

Como se utiliza en la presente, "secuencia de control de la expresión" significa una secuencia de ácidos nucleicos que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de la expresión puede ser un promotor, tal como un promotor o intensificador inducible o

constitutivo. La secuencia de control de la expresión puede operarse enlazada a la secuencia de ácidos nucleicos que se va a transcribir.

Como se utiliza en la presente, "portador
5 farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que, cuando se combina con un ingrediente activo, permite a los ingredientes retener su actividad biológica y no es reactivo con el sistema inmune del sujeto. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a
10 cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar tales como una solución salina amortiguada con fosfato, agua, emulsiones tales como la emulsión de aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Los diluyentes preferidos para aerosol o administración parenteral son la solución salina
15 amortiguada con fosfato (PBS) o solución salina normal (al 0.9%). Las composiciones que comprenden tales portadores se formulan mediante métodos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA,
20 1990; y Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20a edición, Mack Publishing, 2000).

El término "función efectora" se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo (ADCC), unión al receptor Fc, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), fagocitosis, unión Clq y desregulación de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR). Ver, por ejemplo, Patente de los EE. UU. No. 6,737,056.

10 Tales funciones efectoras requieren en general que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y puede evaluarse utilizando diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar tales funciones efectoras del anticuerpo. Una medición ejemplar de

15 la función efectora es a través de la unión de Fcγ3 y/o Clq.

Como se utiliza en la presente "toxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una reacción mediada por células en la cual las células citotóxicas no específicas que expresan los receptores Fc

20 (FcR) (por ejemplo, células exterminadoras naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo de unión a una célula objetivo y posteriormente provoca la lisis de la

célula objetivo. La actividad de ADCC de una molécula de interés puede evaluarse utilizando un ensayo ADCC *in vitro*, tal como se describe en la Patente de los EE. UU. No. 5,500,362 o 5,821,337. Las células efectoras útiles para
5 tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células NK. Alternativa o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se describe en Clynes et al., 1998, *PNAS (EE. UU.)*, 95:652-656.

10 “Citotoxicidad dependiente del complemento” o “CDC” se refiere al lisado de un objetivo en presencia de complemento. La ruta de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) acompañado
15 con un antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202: 163 (1996).

20 Como se utiliza en la presente, el término “ k_{on} ” o “ k_a ”, se refiere a la constante de velocidad para la asociación de un anticuerpo a un antígeno. Específicamente, las constantes de velocidad (k_{on} o k_a y k_{off} o k_d) y las

constantes de disociación de equilibrio se miden utilizando el anticuerpo completo (es decir, bivalente) y proteínas de GITR monoméricas.

Como se utiliza en la presente, el término " k_{off} " o
5 " k_d ", se refiere a la constante de velocidad para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.

Como se utiliza en la presente, el término " K_D ", se refiere a la constante de disociación de equilibrio de una
10 interacción anticuerpo-antígeno.

Con referencia a "aproximadamente", un valor o parámetro en la presente incluye (y describe) modalidades que están dirigidas a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, La descripción denominada "aproximadamente X" incluye la
15 descripción de "X." Los márgenes numéricos son inclusivos de los números que definen el margen. Generalmente hablando, el término "aproximadamente" se refiere al valor indicado de la variable y a todos los valores de la variable que están dentro del error experimental del valor indicado (por
20 ejemplo, dentro del intervalo de confianza al 95% para la media) o dentro del 10 por ciento del valor indicado, lo que sea mayor. Cuando el término "aproximadamente" se usa dentro

del contexto de un período de tiempo (años, meses, semanas, días, etc.), el término "aproximadamente" significa ese período de tiempo más o menos una cantidad del siguiente período de tiempo subordinado (por ejemplo, aproximadamente 1
5 año significan 11-13 meses; aproximadamente 6 meses significa 6 meses más o menos una semana; aproximadamente 1 semana significa 6-8 días; etc.) o dentro del 10 por ciento del valor indicado, lo que sea mayor.

El término "intensificador de las células efectoras
10 inmunes" o "intensificador IEC" se refiere a una sustancia capaz de incrementar o intensificar el número, calidad o función de uno o más tipos de células efectoras inmunes de un mamífero. Ejemplo de células efectoras inmunes incluyen células T CD8 citolíticas, células T CD4, células NK y
15 células B.

El término "modulador inmune" se refiere a una sustancia capaz de alterar (por ejemplo, inhibir, reducir, incrementar, intensificar o estimular) la respuesta inmune (como se define en la presente) o el trabajo de cualquier
20 componente del sistema inmune celular innato, humoral o celular de un mamífero huésped. De este modo, el término "modulador inmune" abarca al "intensificador de células

efectoras inmunes" como se define en la presente y el "inhibidor de células inmunosupresoras" como se define en la presente, así como la sustancia que afecta otros componentes del sistema inmune de un mamífero.

5 El término "respuesta inmune" se refiere a cualquier respuesta detectable de una sustancia particular (tal como un antígeno o inmunógeno) por el sistema inmune de un mamífero huésped, tal como las respuestas inmunes innatas (por ejemplo, activación de la cascada de señalización del
10 receptor Toll), respuestas inmunes mediadas por células (por ejemplo, respuestas mediadas por células T, tales como células T específicas del antígeno y células no específicas del sistema inmune) y las respuestas inmunes humorales (por ejemplo, respuestas mediadas por células B, tales como la
15 generación y secreción de anticuerpos en el plasma, linfa y/o fluidos tisulares).

 El término "inmunogénico" se refiere a la capacidad de una sustancia para provocar, producir, estimular o inducir una respuesta inmune o para mejorar, intensificar,
20 incrementar o prolongar una respuesta inmune pre-existente contra un antígeno particular, ya sea solo o cuando se enlaza a un portador, en presencia o ausencia de un adyuvante.

El término "inhibidor de células inmunosupresoras" o "inhibidor ISC" se refiere a una sustancia capaz de reducir o suprimir el número o función de células inmunosupresoras de un mamífero. Ejemplos de células inmunosupresoras incluye
5 células T reguladoras ("Treg"), células supresoras mieloides derivadas y macrófagos asociados al tumor.

El término "administración intradérmica" o "administrado vía intradérmica" en el contexto de administrar una sustancia a un mamífero que incluye un humano, se refiere
10 a la administración de la sustancia en la capa dérmica de la piel del mamífero. La piel de un mamífero se compone de una capa epidérmica, una capa dérmica y una capa subcutánea. La epidermis es la capa exterior de la piel. La dermis, que es la capa media de la piel, contiene extremos nerviosos,
15 glándulas sudoríparas y glándulas de aceite (sebáceas), folículos pilosos y vasos sanguíneos. La capa subcutánea está hecha de tejido adiposo y conectivo que aloja los vasos sanguíneos y nervios más grandes. En contraste con la administración intradérmica, la "administración subcutánea"
20 se refiere a la administración de una sustancia en la capa subcutánea y la "administración tópica" se refiere a la

administración de una sustancia sobre la superficie de la piel.

El término "trastorno neoplásico" se refiere a un padecimiento en el cual las células proliferan a una tasa descontrolada y anormalmente alta, la tasa sobrepasa y no se coordina con la de los tejidos normales circundantes. Usualmente resulta en una lesión o bulto sólido conocido como "tumor." Este término abarca trastornos neoplásicos benignos y malignos. El término "trastorno neoplásico maligno", que se utiliza de modo intercambiable con el término "cáncer" en la presente descripción, se refiere a un trastorno neoplásico caracterizado por la capacidad de las células de tumor de propagarse a otros sitios del cuerpo (conocidos como "metástasis"). El término "trastorno neoplásico benigno" se refiere a un trastorno neoplásico en el cual las células de tumor carecen de la capacidad de hacer metástasis.

El término "que evita" o "evitar" se refiere a (a) mantener un trastorno desde que aparece o (b) retardar el inicio de un trastorno o inicio de los síntomas de un trastorno.

El término "antígeno asociado al tumor" o "TAA" se refiere a un antígeno que se expresa específicamente por las

células de tumor o se expresa a una mayor frecuencia o densidad por las células de tumor que por las células sin tumor del mismo tipo de tejido. Los antígenos asociados al tumor pueden ser antígenos que no se expresan normalmente por el huésped; mutan, se truncan, se pliegan mal o de otro modo son manifestaciones anormales de moléculas normalmente expresadas por el huésped; pueden ser idénticas a las moléculas expresadas normalmente, pero expresadas a niveles anormalmente altos; o pueden expresarse en un contexto o medio, es decir, anormal. Los antígenos asociados al tumor pueden ser, por ejemplo, proteínas o fragmentos de proteína, carbohidratos complejos, gangliósidos, haptenos, ácidos nucleicos o cualquier combinación de estas u otras moléculas biológicas.

El término "vacuna" se refiere a una composición inmunogénica para la administración a un mamífero para producir una respuesta inmune contra un antígeno particular en el mamífero. Una vacuna típicamente contiene un agente (conocido como "antígeno" o "inmunógeno") que parece o se deriva del objetivo de la respuesta inmune, tal como un microorganismo que provoca enfermedad o células de tumor. Una vacuna prevista para el tratamiento de un tumor, tal como un

cáncer, normalmente contiene un antígeno, es decir, derivado de un TAA encontrado en el tumor objetivo y es capaz de producir inmunogenicidad contra el TAA en el tumor objetivo.

Se entenderá que dondequiera que las modalidades se describan en la presente con el idioma "que comprende", también se proporcionan de otro modo las modalidades análogas descritas en términos de "que consiste de" y/o "que consiste esencialmente de".

Cuando los aspectos o modalidades de la invención se describen en términos de un grupo de Markush u otra agrupación de alternativas, la presente invención no solo abarca todo el grupo listado como un todo, sino cada miembro del grupo de modo individual y todos los subgrupos posibles del grupo principal, sino también el grupo principal ausente de uno o más de los miembros del grupo. La presente invención también visualiza la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo de la invención reivindicada.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por aquel con experiencia ordinaria en la técnica a la cual

pertenece esta invención. En caso de conflicto, controlará la presente especificación incluyendo definiciones. A través de toda esta especificación y reivindicaciones, se entenderá que la palabra "comprende" o variaciones tales como "comprender" o "que comprende" implica la inclusión de un número entero 5 establecido o grupo de números enteros, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros. A menos que se requiera de otro modo por el contexto, los términos en singular deberán incluir las pluralidades y los 10 términos en plural deberán incluir el singular. Cualesquier ejemplos después del término "por ejemplo" o "por ejemplo" no significa que sea exhaustivo o limitante.

Se describen en la presente métodos y materiales ejemplares, aunque también pueden utilizarse los métodos y 15 materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente en la práctica o prueba de la presente invención. Los materiales, métodos y ejemplos solo son ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

20 Anticuerpos anti-GITR

Se proporcionan en la presente anticuerpos anti-GITR que tienen las propiedades de impulsar la inmunidad

anti-tumor que resulta en la regresión del tumor. Un anticuerpo anti-GITR de la presente invención muestra las siguientes características: (a) suprimir las Treg que infiltran el tumor a través de la función de la citotoxicidad dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o fagocitosis dependiente del anticuerpo (ADCP); (b) unirse a GITR en las células T efectoras e intensificar directamente la activación de células T efectoras; y/o (c) intensificar las funciones efectoras de las células T efectoras y la supervivencia de células T CD8+.

Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden abarcar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados, de cadena simple (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas fusión que comprenden una porción de anticuerpo (por ejemplo, un dominio de anticuerpo), anticuerpos humanizados y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno de la especificidad requerida, incluyendo variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de la secuencia de

aminoácidos de los anticuerpos y anticuerpos modificados de modo covalente. Los anticuerpos pueden ser de murino, rata, humano o cualquier otro origen (incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-GITR es un anticuerpo monoclonal. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado.

Los anticuerpos anti-GITR pueden hacerse mediante cualquier método conocido en la técnica. Las técnicas generales de producción de anticuerpos humanos y de ratón se conocen en la técnica y/o se describen en la presente.

Los anticuerpos anti-GITR pueden identificarse o caracterizarse utilizando métodos conocidos en la técnica, donde se detecta la actividad de unión a GITR. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-GITR se identifica al incubar un agente candidato con GITR y unión de monitoreo. El ensayo de unión puede realizarse, por ejemplo, con polipéptidos de GITR purificados o con células que se expresan de forma natural (por ejemplo, diversas cepas) o transfectarse para expresar los polipéptidos de GITR. En una modalidad, el ensayo de unión es un ensayo de unión competitiva donde se evalúa la capacidad de un anticuerpo candidato para competir

con un anticuerpo anti-GITR conocido para la unión de GITR. El ensayo debe realizarse en diversos formatos, incluyendo el formato ELISA. En algunas modalidades, se identifica un anticuerpo anti-GITR al incubar un anticuerpo candidato con
5 GITR y unión de monitoreo.

Después de la identificación inicial, La actividad de un anticuerpo anti-GITR candidato además puede confirmarse y refinarse mediante bioensayos conocidos por probar las actividades biológicas dirigidas. En algunas modalidades, se
10 utiliza un ensayo celular *in vitro* para caracterizar además un anticuerpo anti-GITR candidato.

Los anticuerpos anti-GITR pueden caracterizarse utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método es para identificar el epítipo al cual se une o el
15 "mapeo del epítipo". Existen muchos métodos conocidos en la técnica para mapear y caracterizar la ubicación de los epítopos en proteínas, incluyendo resolver la estructura cristalina de un complejo de anticuerpo-antígeno, ensayos de competencia, ensayos de expresión de fragmentos de genes y
20 ensayos a base de péptidos sintéticos, como se describe, por ejemplo, en el Capítulo 11 de Harlow y Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999. En un ejemplo adicional, el mapeo de epítomos puede utilizarse para determinar la secuencia en la cual se une un anticuerpo anti-GITR. El mapeo de epítomos está comercialmente disponible a
5 partir de diversas fuentes, por ejemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Países bajos). El epítopo puede ser un epítopo lineal, es decir, contenido en una sola extensión de aminoácidos o un epítopo conformacional formado por una interacción tridimensional de aminoácidos que no
10 necesariamente pueden estar contenidos en una sola extensión. Los péptidos de longitudes variantes (por ejemplo, de al menos 4-6 aminoácidos de largo) pueden aislarse o sintetizarse (por ejemplo, de modo recombinante) y utilizarse para los ensayos de unión con un anticuerpo anti-GITR. En
15 otro ejemplo, el epítopo al cual se une el anticuerpo anti-GITR puede determinarse en una selección sistemática al utilizar los péptidos que se superponen derivados de la secuencia de GITR y determinar la unión por el anticuerpo anti-GITR. De acuerdo con los ensayos de expresión del
20 fragmento génico, el marco de lectura abierta que codifica GITR se fragmenta ya sea al azar o mediante construcciones genéticas específicas y se determina la reactividad de los

fragmentos expresados de GITR con el anticuerpo que se va a probar. Los fragmentos génicos pueden, por ejemplo, producirse mediante PCR y después transcribirse y trasladarse *in vitro* en proteínas, en presencia de aminoácidos radioactivos. Entonces se determina la unión del anticuerpo a los fragmentos de GITR etiquetados de forma radioactiva mediante inmunoprecipitación y electroforesis en gel. Ciertos epítomos también pueden identificarse al utilizar grandes bibliotecas de secuencias de péptidos al azar mostradas en la superficie de las partículas del fago (bibliotecas de fagos) o levaduras (que muestran levaduras). Alternativamente, puede probarse una biblioteca definida para superponer fragmentos peptídicos para unirlos al anticuerpo de prueba en ensayos de unión simple. En un ejemplo adicional, puede realizarse la mutagénesis de un antígeno, experimentos de intercambio de dominio y mutagénesis por barrido de alanina para identificar los residuos requeridos, suficientes y/o necesarios para la unión del epítomo. Por ejemplo, los experimentos de mutagénesis por barrido de alanina pueden realizarse utilizando un GITR mutante en el cual diversos residuos del polipéptido GITR se han reemplazado con alanina. Al evaluar la unión del anticuerpo con el GITR mutante, puede evaluarse

la importancia de los residuos G1TR particulares en la unión del anticuerpo.

Incluso otro método que puede utilizarse para caracterizar un anticuerpo anti-G1TR es utilizar ensayos de competencia con otros anticuerpos conocidos por unirse al mismo antígeno, es decir, diversos fragmentos de G1TR, para determinar si el anticuerpo anti-G1TR se une al mismo epítipo como otros anticuerpos. Los ensayos de competencia se conocen bien por aquellos con experiencia en la técnica, incluyendo en un formato ELISA.

La afinidad de unión (K_D) de un anticuerpo anti-G1TR a G1TR puede ser de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 200 nM. En algunas modalidades, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 200 nM, aproximadamente 150 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 20 nM, aproximadamente 19 nM, aproximadamente 18 nM, aproximadamente 17 nM, aproximadamente 16 nM, aproximadamente 15 nM, aproximadamente 14 nM, aproximadamente 13 nM, aproximadamente 12 nM, aproximadamente 11 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 9 nM, aproximadamente 8 nM, aproximadamente 7 nM, aproximadamente 6 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 4

nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 2 pM o aproximadamente 1 pM. En algunas modalidades, la afinidad de unión es menor de cualquiera de aproximadamente 250 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5 pM o aproximadamente 2 pM.

En consecuencia, la invención proporciona cualquiera de lo siguiente o composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) que comprende un anticuerpo que tiene una secuencia de cadena ligera parcial y una secuencia de cadena pesada parcial como se encuentra en la Tabla 1 o variantes de la misma. En la Tabla 1, las secuencias subrayadas son secuencias CDR de acuerdo con Kabat y en negritas de acuerdo con Chothia.

Tabla 1: Secuencias de regiones variables de anticuerpos anti-GITR

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
m3G7	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNFGI <u>NFMNWFQQKSGQPPKLLIYAASNQSG</u> GVPARFSG SGSGTDFSLDIHPMEEDDTAMYFC <u>QOSKELPWT</u> F GGGKLEIK (SEQ ID NO: 1)	EVQLQQSGPERVKPGASMKISCKVSGYSFTDYTMN WVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGIRYNQKFKGKASL TVDKSSNTAYMELLSLTSEDSAVYYCAR <u>IGGYYDS</u> <u>MDYWGQGT</u> SVTVSS (SEQ ID NO: 2)
h3G7 VL1.1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNFGI <u>NFLNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQSG</u> GVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QOSKELPWT</u> F GGGKVEIK (SEQ ID NO: 3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSFTDYTMN WVRQAPGKGLEWVALINPYNGGIRYNQKFKGRFTI SVDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>IGGYYDS</u> <u>MDYWGQGT</u> LVTVSS (SEQ ID NO: 4)
h3G7 H1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNFGI <u>NFLNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQSG</u> GVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QOSKELPWT</u> F GGGKVEIK (SEQ ID NO: 5)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYTMN WVRQAPGKGLEWVALINPYNGGIRYNQKFKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>IGGYYDS</u> <u>MDYWGQGT</u> LVTVSS (SEQ ID NO: 6)
h3G7 H2	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRAESVDNFGI <u>NFMNWFQQKPGQAPRLIYAASNQSG</u> GIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOSKELPWT</u> F GGGKVEIK (SEQ ID NO: 7)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYTFTDYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYNGGIRYNQKFKGRVTM TRDTSTSTVYMELSSLRSEDYAVYYCAR <u>IGGYYDS</u> <u>MDYWGQGT</u> LVTVSS (SEQ ID NO: 8)
h3G7 AM	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDPNGI <u>NFLNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQAK</u> GVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QQAELPWT</u> F GGGKVEIK (SEQ ID NO: 9)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYTFTGATMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYNGGIRYNQKFKGRVTM TRDTSTSTVYMELSSLRSEDYAVYYCAR <u>IGGYYDS</u> <u>MDYWGQGT</u> LVTVSS (SEQ ID NO: 10)
h3G7 R5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVEPRGI <u>NFLNWFQQKPGKAPKLLIYAASQASK</u> GVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QQAELPWT</u> F GGGKVEIK (SEQ ID NO: 11)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYTFTGATMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYTGGIRYNQKFKGRVTM TRDTSTSTVYMELSSLRSEDYAVYYCAR <u>IGGYYDS</u> <u>MDYWGQGT</u> LVTVSS (SEQ ID NO: 12)
h3G7 LF	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVEPRGI <u>NFLNWFQQKPGKAPKLLIYAASQASK</u> GVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QQAELPWT</u> F GGGKVEIK (SEQ ID NO: 13)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYTFTGATMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYTGGIRYNQKFKGRVTM TRDTSTSTVYMELSSLRSEDYAVYYCAR <u>IGGYYDT</u> <u>MDYWGQGT</u> LVTVSS (SEQ ID NO: 14)
h3G7 N9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVQPRGI NFLNWFQQKPGKAPKLLIYAASNPSKGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAELPWT GGGKVEIK (SEQ ID NO: 111)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYTFTGYTVS WVRQAPGQGLEWMGLINPYTGGIRYNQKFKGRVTM TRDTSTSTVYMELSSLRSEDYAVYYCARIGGYYDS MDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 112)
m10H2	DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTSIH WYQRTNGSPRLLIKYASESVSGIPSRFSGSGSG TDFTLFINSVESEDIADYYCQQTYSWPATFGAGT KLELK (SEQ ID NO: 15)	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCTATGYTISRWIE WVKQRPBGHLEWIGEILPGSGVTNYNEKFKGKATF TADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYSCARKGTYIAM DYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 16)

5	h10H2 HU	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC <u>RASQSIGTSIH</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>YASESVS</u> GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOTYSWPAT</u> FGQGT KVEIK (SEQ ID NO: 17)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAS <u>GGTFSRYWIE</u> WVRQAPGQGLEWMGEI <u>LPGSGV</u> TNYNEKFKGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARK <u>KGTYYAM</u> <u>DY</u> WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 18)
	h10H2 AM	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC <u>RASQSIGTSIH</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>YASESVS</u> GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOTYSWPAT</u> FGQGT KVEIK (SEQ ID NO: 19)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAS <u>GGTFSRYWIE</u> WVRQAPGQGLEWMGEI <u>LPGSGV</u> TFENEKFKGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARK <u>KGRYYAM</u> <u>DY</u> WGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 20)
	h10H2 N13	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC <u>RASQSIGTSIH</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>YASESVS</u> GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOTYSWPAT</u> FGQGT KVEIK (SEQ ID NO: 120)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAS <u>GGTFSRYWIE</u> WVRQAPGQGLEWMGEI <u>LPGSGV</u> EWYNEKFKGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARK <u>KGRGYAM</u> <u>DY</u> WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 121)
	h10H2 N14	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC <u>RASQSIGTSIH</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>YASESVS</u> GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOTYSWPAT</u> FGQGT KVEIK (SEQ ID NO: 122)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAS <u>GGTFSRYWIE</u> WVRQAPGQGLEWMGEI <u>LPGSGV</u> TFENEKFKGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARK <u>KGRYYAM</u> <u>DY</u> WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 123)
10	r18H1 2	DIVMTQSPSSLAVSAGETVTINC <u>KSSQSLLYSGN</u> <u>QKS</u> YLAWYQQKPGQSPKLLIY <u>WASPRQS</u> GVPDFR IGSGSGTDFTLTISVQAEDMATYYC <u>QQYYDAPP</u> <u>T</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 69)	EVQLVESDGVLVQPGKSLTSLCAAS <u>GFTFSDYYMA</u> WVRQAPTKGLEWVAI <u>ISYDDIT</u> TFYRDSVKGRFTI SRDTAKSTLYLQMDSLRSEDTATYYCTRGL <u>QWPYV</u> <u>MDA</u> WGQALVTVSS (SEQ ID NO: 70)
	r21B6	EIVLTQSPPTMAASPGKVTITC <u>RASSSLNYMHW</u> FQQKSGTSPKPWIY <u>DTSELAS</u> GVPDFRSGSGSGT SYSLTISSMEAEDAATYYC <u>LQKNGYPLT</u> FGSGTK LEIK (SEQ ID NO: 71)	EAQLVESGGGLVQPGSRSLKLSCEAS <u>GFTFTKYGMA</u> WVRQAPTKGLEWVASI <u>INSGGN</u> TYRDSVKGRFTI SRDNAKSTLYLQMDSLRSEDTATYYCAT <u>DYYDGSY</u> <u>HSDVVDA</u> WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 72)

La invención también proporciona porciones CDR de anticuerpos a GITR. La determinación de las regiones CDR está bien dentro de la experiencia de la técnica. Se entenderá que, en algunas modalidades, las CDR pueden ser una combinación de las CDR de Kabat y Chothia (también llamadas "CDR combinadas" o "CDR extendidas"). En otro procedimiento, se denominan en la presente como la "definición conformacional" de las CDR, las posiciones de las CDR pueden identificarse como los residuos que hacen contribuciones entálpicas a la unión del antígeno. Véase, por ejemplo,

Makabe et al., 2008, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166. En general, las "CDR conformacionales" incluyen las posiciones de residuos en las CDR de Kabat y las zonas de Vernier que están contraídas para mantener la estructura de bucle apropiada para que el anticuerpo se una a un antígeno específico. La determinación de las CDR conformacionales es bien conocida dentro de la experiencia de la técnica. En algunas modalidades, las CDR son las CDR de Kabat. En otras modalidades, las CDR son las CDR de Chothia.

En otras modalidades, las CDR son las CDR extendidas, AbM, conformacionales o de contacto. En otras palabras, en modalidades con más de una CDR, las CDR pueden ser cualquiera de las CDR de Kabat, Chothia, extendidas, AbM, CDR conformacionales, de contacto o combinaciones de las mismas.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende tres CDR de cualquiera de las regiones variables de cadena pesada mostradas en la Tabla 1. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende tres CDR de cualquiera de las regiones variables de cadena ligera mostradas en la Tabla 1. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende tres CDR de cualquiera de las regiones variables de cadena pesada

mostradas en la Tabla 1 y tres CDR de cualquiera de las regiones variables de cadena ligera mostradas en la Tabla 1.

En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a GITR y
5 comprende: una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH y CDR3 VH de la VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 112; y/o una
región variable de cadena ligera (VL) que comprende una CDR1
10 VL, CDR2 VL y CDR3 VL de la VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 111.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ
15 ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 112 o una variante de la misma con una o varias sustituciones de aminoácidos conservadoras en los residuos que no están dentro de una CDR.
En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:
20 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 111 o una variante de la misma con una o varias sustituciones de aminoácidos en los aminoácidos que no están dentro de una CDR.

En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a GITR y comprende: una VH que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH y CDR3 VH de la VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 16, 18, 20, 121 y 123; y/o una VL que comprende una CDR1 VL, CDR2 VL y CDR3 VL de la VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 15, 17, 19, 120 y 122.

En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a GITR y comprende: una VH que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH y CDR3 VH de la VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 70 y 72; y/o una VL que comprende una CDR1 VL, CDR2 VL y CDR3 VL de la VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 69 y 71.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la cadena pesada de longitud completa, con o sin la lisina C-terminal y/o la cadena ligera de longitud completa del anticuerpo anti-GITR. Por ejemplo, el anticuerpo anti-GITR comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de

aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 110 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 109.

La Tabla 2 proporciona ejemplos de secuencias de CDR de los anticuerpos anti-GITR proporcionados en la presente.

Tabla 2. Anticuerpos anti-GITR (mAbs) y sus secuencias de CDR de unión al antígeno de acuerdo con Kabat y Chothia

mAb		CDR1	CDR2	CDR3
m3G7	L	RASESVDNFGINFMN (SEQ ID NO: 21)	AASNQGS (SEQ ID NO: 22)	QQSKELPWT (SEQ ID NO: 23)
	H	GYSFTDY (SEQ ID NO: 24) (Chothia) DYTMN (SEQ ID NO: 25) (Kabat) GYSFTDYTMN (SEQ ID NO: 26) (extendida)	NPYNGG (SEQ ID NO: 27) (Chothia) LINPYNGGIRYNQKFKG (SEQ ID NO: 28) (Kabat)	IGGYDSMDY (SEQ ID NO: 29)
h3G7VL1.1	L	RASESVDNFGINFLN (SEQ ID NO: 30)	AASNQGS (SEQ ID NO: 22)	QQSKELPWT (SEQ ID NO: 23)
	H	GYSFTDY (SEQ ID NO: 24) (Chothia) DYTMN (SEQ ID NO: 25) (Kabat) GYSFTDYTMN (SEQ ID NO: 26) (extendida)	NPYNGG (SEQ ID NO: 27) (Chothia) LINPYNGGIRYNQKFKG (SEQ ID NO: 28) (Kabat)	IGGYDSMDY (SEQ ID NO: 29)

5

10

15

20

h3G7 H1	L	RASESVDNFGINFLN (SEQ ID NO: 30)	AASNQGS (SEQ ID NO: 22)	QQSKELPWT (SEQ ID NO: 23)
	H	GFTFSDY (SEQ ID NO: 32) (Chothia) DYTMN (SEQ ID NO: 25) (Kabat) GFTFSDYTMN (SEQ ID NO: 33) (extendida)	NPYNGG (SEQ ID NO: 27) (Chothia) LINPYNGGIRYNQKFKG (SEQ ID NO: 28) (Kabat)	IGGYDSMDY (SEQ ID NO: 29)
h3G7 H2	L	RASESVDNFGINFMN (SEQ ID NO: 21)	AASNQGS (SEQ ID NO: 22)	QQSKELPWT (SEQ ID NO: 23)
	H	GYTFTDY (SEQ ID NO: 34) (Chothia) DYTMN (SEQ ID NO: 25) (Kabat) GYTFTDYTMN (SEQ ID NO: 35) (extendida)	NPYNGG (SEQ ID NO: 27) (Chothia) LINPYNGGIRYNQKFKG (SEQ ID NO: 28) (Kabat)	IGGYDSMDY (SEQ ID NO: 29)
h3G7 AM	L	RASESVDPRGINFLN (SEQ ID NO: 36)	AASNQAK (SEQ ID NO: 37)	QQALELPWT (SEQ ID NO: 38)
	H	GYTFTGA (SEQ ID NO: 39) (Chothia) GATMN (SEQ ID NO: 40) (Kabat) GYTFTGATMN (SEQ ID NO: 41) (extendida)	NPYNGG (SEQ ID NO: 27) (Chothia) LINPYNGGIRYNQKFKG (SEQ ID NO: 28) (Kabat)	IGGYDSMDY (SEQ ID NO: 29)
h3G7 R5	L	RASESVEPRGINFLN (SEQ ID NO: 42)	AASQASK (SEQ ID NO: 43)	QQALELPWT (SEQ ID NO: 38)
	H	GYTFTGA (SEQ ID NO: 39) (Chothia) GATMN (SEQ ID NO: 40) (Kabat) GYTFTGATMN (SEQ ID NO: 41) (extendida)	NPYTGG (SEQ ID NO: 44) (Chothia) LINPYTGGIRYNQKFKG (SEQ ID NO: 45) (Kabat)	IGGYDSMDY (SEQ ID NO: 29)
h3G7 LF	L	RASESVEPRGINFLN (SEQ ID NO: 42)	AASQASK (SEQ ID NO: 43)	QQALELPWT (SEQ ID NO: 38)
	H	GYTFTGA (SEQ ID NO: 39) (Chothia) GATMN (SEQ ID NO: 40) (Kabat) GYTFTGATMN (SEQ ID NO: 41)	NPYTGG (SEQ ID NO: 44) (Chothia) LINPYTGGIRYNQKFKG (SEQ ID NO: 45) (Kabat)	IGGYDTMDY (SEQ ID NO: 46)
h3G7 N9	L	RASESVQPRGINFLN (SEQ ID NO: 113)	AASNPSK (SEQ ID NO: 114)	QQALELPWT (SEQ ID NO: 38)
	H	GYTFTGY (SEQ ID NO: 116) (Chothia) GYTVS (SEQ ID NO: 117) GYTFTGYTVS (SEQ ID NO: 115)	NPYTGG (SEQ ID NO: 44) (Chothia) LINPYTGGIRYNQKFKG (SEQ ID NO: 45) (Kabat)	IGGYDSMDY (SEQ ID NO: 29)

5

10

15

20

m10H2	L	RASQSIGTSIH (SEQ ID NO: 47)	YASESVS (SEQ ID NO: 48)	QQTYSWPAT (SEQ ID NO: 49)
	H	GYTISRY (SEQ ID NO: 51) (Chothia) RYWIE (SEQ ID NO: 52) (Kabat) GYTISRYWIE (SEQ ID NO: 50) (extendida)	LPGSGV (SEQ ID NO: 54) (Chothia) EILPGSGVTNYNEKFKG (SEQ ID NO: 53) (Kabat)	KGTYIAMDY (SEQ ID NO: 55)
h10H2 HU	L	RASQSIGTSIH (SEQ ID NO: 47)	YASESVS (SEQ ID NO: 48)	QQTYSWPAT (SEQ ID NO: 49)
	H	GGTFSRY (SEQ ID NO: 57) (Chothia) RYWIE (SEQ ID NO: 52) (Kabat) GGTFSRYWIE (SEQ ID NO: 56) (extendida)	LPGSGV (SEQ ID NO: 54) (Chothia) EILPGSGVTNYNEKFKG (SEQ ID NO: 53) (Kabat)	KGTYIAMDY (SEQ ID NO: 55)
h10H2AM	L	RASQSIGTSIH (SEQ ID NO: 47)	YASESVS (SEQ ID NO: 48)	QQTYSWPAT (SEQ ID NO: 49)
	H	GGTFSRY (SEQ ID NO: 57) (Chothia) RYWIE (SEQ ID NO: 52) (Kabat) GGTFSRYWIE (SEQ ID NO: 56) (extendida)	LPGSGV (SEQ ID NO: 59) (Chothia) EILPGSGVTFENEKFKG (SEQ ID NO: 58) (Kabat)	KGRYIAMDY (SEQ ID NO: 60)
h10H2 N13	L	RASQSIGTSIH (SEQ ID NO: 47)	YASESVS (SEQ ID NO: 48)	QQTYSWPAT (SEQ ID NO: 49)
	H	GGTFSRY (SEQ ID NO: 57) (Chothia) RYWIE (SEQ ID NO: 52) (Kabat) GGTFSRYWIE (SEQ ID NO: 56) (extendida)	LPGSGV (SEQ ID NO: 54) (Chothia) EILPGSGVTNYNEKFKG (SEQ ID NO: 53) (Kabat)	KGRGYAMDY (SEQ ID NO: 124)
h10H2 N14	L	RASQSIGTSIH (SEQ ID NO: 47)	YASESVS (SEQ ID NO: 48)	QQTYSWPAT (SEQ ID NO: 49)
	H	GGTFSRY (SEQ ID NO: 57) (Chothia) RYWIE (SEQ ID NO: 52) (Kabat) GGTFSRYWIE (SEQ ID NO: 56) (extendida)	LPGSGV (SEQ ID NO: 59) (Chothia) EILPGSGVTFENEKFKG (SEQ ID NO: 58) (Kabat)	KGRYIAMDY (SEQ ID NO: 60)

5

r18H12	L	KSSQSLLYSGNQKSYLA (SEQ ID NO: 73)	WASPRQS (SEQ ID NO: 74)	QQYYDAPPT (SEQ ID NO: 75)
	H	GFTFSDY (SEQ ID NO: 32) (Chothia) DYMA (SEQ ID NO: 76) (Kabat) GFTFSDYMA (SEQ ID NO: 77) (extendida)	SYDDIT (SEQ ID NO: 78) (Chothia) TISYDDITTFYRDSVKG (SEQ ID NO: 79) (Kabat)	GLQWPYVMDA (SEQ ID NO: 80)
r21B6	L	RASSSLNYMH (SEQ ID NO: 81)	DTSELAS (SEQ ID NO: 82)	LQKNGYPLT (SEQ ID NO: 83)
	H	GFTFTKY (SEQ ID NO: 86) (Chothia) KYGMA (SEQ ID NO: 85) (Kabat) GFTFTKYGMA (SEQ ID NO: 84) (extendida)	SYDDIT (SEQ ID NO: 78) (Chothia) TISYDDITTFYRDSVKG (SEQ ID NO: 79) (Kabat)	DYYDGSYHSDVVDA (SEQ ID NO: 87)

10

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende las tres CDR de cadena ligera y las tres CDR de cadena pesada de la Tabla 2.

15

Una alineación de las CDR de cadena ligera a partir de una cantidad selectiva de anticuerpos anti-GITR se proporciona en la Tabla 3. Los residuos variables se muestran en negritas. Las secuencias de CDR de cadena ligera de consenso se proporcionan en la última hilera de la Tabla 3.

Tabla 3. Alineación de las CDR de cadena ligera de anti-GITR

20

mAb	CDR1 VL	SEQ ID NO:	CDR2 VL	SEQ ID NO:	CDR3 VL	SEQ ID NO:
m3G7	RASESV DNF GINFMN	21	AAS NQGS	22	QQ SK ELPWT	23

5

h3G7V L1.1; h3G7 H1	RASESV DN FGINFLN	30	AAS NQGS	22	QQ S KELPWT	23
h3G7 H2	RASESV DN FGIN FM N	21	AAS NQGS	22	QQ S KELPWT	23
h3G7 AM	RASESV DPR GINFLN	36	AAS NQAK	37	QQ AL ELPWT	38
h3G7 R5; h3G7 LF	RASESV EP RGINFLN	42	AAS QASK	43	QQ AL ELPWT	38
	RASESV X₁X₂X₃ GINF X₄ N, en donde X₁ es D, Q o E, X₂ es No P, X₃ es F o R, X₄ es M o L	31	AAS X₁X₂X₃X₄ , en donde X₁ es No Q, X₂ es Q, P o A, X₃ es G, A o S, X₄ es S o K	61	QQ X₁X₂ ELPWT, en donde X₁ es S o A y X₂ es K o L	62

Una alineación de CDR de cadena pesada a partir de una cantidad selectiva de anticuerpos anti-GITR se proporciona en la Tabla 4. Los residuos variables se muestran en negritas. Las secuencias CDR de cadena pesada de consenso se proporcionan en la última hilera de la Tabla 4.

Tabla 4. Alineación de las CDR de cadena pesada anti-GITR

15

mAb	CDR1 VH	SEQ ID NO:	CDR2 VH	SEQ ID NO:	CDR3 VH	SEQ ID NO:
m3G7; h3G7V L1.1;	GYSFTDY (Chothia)	24	NPY NGG (Chothia)	27	IGGYDY SMDY	29
	DY TMN (Kabat)	25	LINPY NGG IRYNQ	28		
	GYSFTDY TMN (extendida)		KFKG (Kabat)			
h3G7 H1	GFTFSDY (Chothia)	32	NPY NGG (Chothia)	27	IGGYDY SMDY	29
	DY TMN (Kabat)	25	LINPY NGG IRYNQ	28		
	GFTFSDY TMN (extendida)	33	KFKG (Kabat)			

20

5

10

15

20

5	h3G7 H2	GYFTDY (Chothia) DYTMN (Kabat) GYFTDYTMN (extendida)	34 25 35	NPYNGG (Chothia) LINPYNGGIRYNQ KFKG (Kabat)	27 28	IGGYYDSMDY	29
	h3G7 AM	GYFTGA (Chothia) GATMN (Kabat) GYFTGATMN (extendida)	39 40 41	NPYNGG (Chothia) LINPYNGGIRYNQ KFKG (Kabat)	27 28	IGGYYDSMDY	29
	H3G7 R5	GYFTGA (Chothia) GATMN (Kabat) GYFTGATMN (extendida)	39 40 41	NPYTGG (Chothia) LINPYTGGIRYNQ KFKG (Kabat)	44 45	IGGYYDSMDY	29
	h3G7LF	GYFTGA (Chothia) GATMN (Kabat) GYFTGATMN (exten dida)	39 40 41	NPYTGG (Chothia) LINPYTGGIRYNQ KFKG (Kabat)	44 45	IGGYYDTMDY	46
	h3G7N9	GYFTGY (Chothia) GATVS (Kabat) GYFTGATMN (exten dida)	39 40 41	NPYTGG (Chothia) LINPYTGGIRYNQ KFKG (Kabat)	44 45	IGGYYDTMDY	46
15		GX ₁ X ₂ FX ₃ X ₄ X ₅ , en donde X ₁ es Y o F, X ₂ es S o T, X ₃ es T o S, X ₄ es D o G, X ₅ es Y o A (Chothia); X ₁ X ₂ T X ₃ X ₄ , en donde X ₁ es D o G, X ₂ es Y o A, X ₃ es V o M, X ₄ es S o N (Kabat) GX ₁ X ₂ FX ₃ X ₄ X ₅ TX ₆ X ₇ , en donde X ₁ es Y o F, X ₂ es S o T, X ₃ es T o S, X ₄ es D o G, X ₅ es Y o A, X ₆ es V o M, X ₇ es S o N (extendida)	63 64 65	NPYX ₁ GG, en donde X ₁ es N o T (Chothia) LINPYX ₁ GGIRYNQ KFKG, en donde X ₁ es No T (Kabat)	66 67	IGGYYDX ₁ MDY, en donde X ₁ es S o T	68

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende las tres CDR de cadena ligera de la Tabla 3 y las tres CDR de cadena pesada de la Tabla 4.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una CDR1 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, 25, 26, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 41, 115, 116, 117, 63, 64 o 65, una CDR2 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27, 28, 44, 45, 66 o 67 y una CDR3 VH que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 29, 46 o 68; y/o una CDR1 VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 21, 30, 36, 42, 113 o 31, una CDR2 VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22, 37, 43, 114 o 61 y una CDR3 VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23, 38 o 62.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una CDR1 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50, 51, 52, 56 o 57, una CDR2 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, 54, 58 o 59 y una CDR3 VH que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 55, 60 o 124; y/o una CDR1 VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 47, una CDR2

VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 48 y una CDR3 VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 49.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una CDR1 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, 76, 77, 84, 85 u 86, una CDR2 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 o 79 y una CDR3 VH que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 80 u 87; y/o una CDR1 VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 73 u 81, una CDR2 VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 74 u 82 y una CDR3 VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 75 u 83.

La invención también proporciona métodos para generar, seleccionar y elaborar anticuerpos anti-GITR. Los anticuerpos de esta invención pueden hacerse mediante procedimientos conocidos en la técnica. En algunas modalidades, los anticuerpos pueden hacerse de modo recombinante y expresarse utilizando cualquier método conocido en la técnica.

En algunas modalidades, los anticuerpos pueden prepararse y seleccionarse mediante la tecnología de

despliegue de fagos. Ver, por ejemplo, las Patentes de los EE. UU. Nos. 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; y 6,265,150; y Winter et al., Annu. Rev. Immunol. 12:433-455, 1994. Alternativamente, la tecnología de despliegue de fagos

5 (McCafferty et al., Nature 348:552-553, 1990) puede utilizarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de los repertorios génicos de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donadores no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes de

10 dominio V de anticuerpo se clonan en el marco en cualquiera de una proteína de recubrimiento mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd y se despliega como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa

15 contiene una copia de ADN de una sola cadena del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también resultan en la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. De este modo, el fago imita algunas de las propiedades de las células

20 B. El despliegue del fago puede realizarse en una variedad de formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural

Biology 3:564-571, 1993. Diversas fuentes de segmentos de genes V pueden utilizarse para el despliegue de fagos. Clackson et al., Nature 352:624-628, 1991, aislaron una disposición diversa de anticuerpos anti-oxazolón a partir de una pequeña biblioteca combinatorial al azar de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V a partir de donadores y anticuerpos humanos en una disposición diversa de antígenos (incluyendo auto-antígenos) que puede aislarse esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Mark et al., J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991 o Griffith et al., EMBO J. 12:725-734, 1993. En una respuesta inmune natural, los genes de anticuerpos acumulan mutaciones en una alta tasa (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán una mayor afinidad y las células B que muestren una inmunoglobulina de superficie de alta afinidad se replicarán de preferencia y diferenciarán durante la exposición al antígeno posterior. Este proceso natural puede imitarse al emplear la técnica conocida como "recombinación de cadenas". (Marks et al., Bio/Technol. 10:779-783, 1992). En este método, la afinidad de los anticuerpos humanos "primarios" obtenidos mediante el despliegue de fagos puede

mejorarse al reemplazar de modo secuencial los genes de la región V de cadena pesada y ligera con repertorios de variantes de origen natural (repertorios) de los genes de dominio V obtenidos a partir de donadores no inmunizados.

5 Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades en el margen pM-nM. Se ha descrito una estrategia para hacer repertorios de anticuerpos de fagos muy largos (también conocidos como "la madre de todas las bibliotecas") por Waterhouse et al., Nucl.

10 Acids Res. 21:2265-2266, 1993. La recombinación génica también puede utilizarse para derivar anticuerpos humanos a partir de anticuerpos de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo de roedor de partida. De acuerdo con este método, el cual

15 también se denomina como la "impresión del epítopo", el gen de dominio V de cadena pesada o ligera de los anticuerpos de roedor obtenidos mediante la técnica de despliegue de fagos se reemplaza con un repertorio de genes de dominio V humano, creando quimeras de roedor-humano. La selección del antígeno

20 resulta en el aislamiento de las regiones variables humanas capaces de restaurar un sitio de unión al antígeno funcional, es decir, el epítopo gobierna (imprime) la elección del

progenitor. Cuando el proceso se repite para reemplazar el dominio V de roedor restante, se obtiene un anticuerpo humano (ver publicación PCT No. WO 93/06213). A diferencia de la humanización tradicional de los anticuerpos de roedor
5 mediante injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos que no tienen marco o residuos de CDR de origen de roedor.

En algunas modalidades, los anticuerpos pueden elaborarse utilizando la tecnología del hibridoma. Se
10 contempla que cualquier sujeto mamífero incluyendo humanos o células que producen anticuerpos de los mismos pueda manipularse para servir como la base de producción de líneas celulares de hibridoma de mamífero, incluyendo de humano. La ruta y esquema de inmunización del animal huésped en general
15 se mantiene con técnicas convencionales y establecidas para la simulación y producción del anticuerpo, como se describe además en la presente. Normalmente, el animal huésped se inoculara vía intraperitoneal, intramuscular, oral, subcutánea, intraplantar y/o intradérmica con una cantidad de inmunógeno,
20 incluida como se describe en la presente.

Los hibridomas pueden prepararse a partir de los linfocitos y células de mieloma inmortalizadas utilizando la

técnica general de hibridación de células somáticas de Kohler, B. y Milstein, C., 1975, Nature 256:495-497 o como se modifica por Buck, D. W., et al., In Vitro, 18:377-381, 1982. Las líneas de mieloma disponibles, que incluyen pero no se limitan a X63-Ag8.653 y pueden utilizarse en la hibridación aquellas del Centro de Distribución Celular del Instituto Salk de San Diego, California, EE. UU. En general, la técnica implica células de mieloma de fusión y células linfoides que utilizan un fosgeno tal como polietilenglicol o por medios eléctricos bien conocidos por aquel con experiencia en la técnica. Después de la fusión, las células se separan del medio de fusión y crecen en un medio de crecimiento selectivo, tal como hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) para eliminar las células progenitoras no hibridadas. Cualquiera de los medios descritos en la presente y suplementados con o sin suero pueden utilizarse para cultivar hibridomas que secreten anticuerpos monoclonales. Como otra alternativa de la técnica de fusión celular, pueden utilizarse las células B inmortalizadas por EBV para producir los Anticuerpos monoclonales de GITR de la invención objeto. Si se desea, los hibridomas u otras células B inmortalizadas se expanden y subclonan y los sobrenadantes se evalúan para

actividad anti-inmunogénica mediante procedimientos de inmunoensayo convencionales (por ejemplo, radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático o inmunoensayo por fluorescencia).

Los hibridomas que pueden utilizarse como Fuente de anticuerpos abarcan todos los derivados, células progenitoras de los hibridomas progenitores que producen anticuerpos monoclonales específicos para GITR o una porción de los mismos.

Hibridomas que producen tales anticuerpos pueden desarrollarse *in vitro* o *in vivo* utilizando procedimientos conocidos. Si se desea, los anticuerpos monoclonales pueden aislarse a partir del medio de cultivo o fluidos corporales mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina tales como precipitación de sulfato de amonio, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía y ultrafiltración. Si la actividad no deseada está presente, puede eliminarse, por ejemplo, al correr la preparación sobre los adsorbentes elaborados del inmunógeno unido a una fase sólida y eluir o liberar los anticuerpos deseados fuera del inmunógeno. La inmunización de un animal huésped con un polipéptido de GITR o un fragmento que contenga la secuencia de aminoácidos objetivo conjugada a una proteína, es decir,

inmunogénica en las especies que se van a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, inhibidor de tiroglobulina de bovino o tripsina de soya utilizando un agente bifuncional o derivado, por ejemplo, 5 éster de maleimidobenzoyl sulfosuccinimida (conjugación a través de los residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes, puede producir una población de anticuerpos (por 10 ejemplo, anticuerpos monoclonales).

Si se desea, el anticuerpo anti-GITR (monoclonal o policlonal) de interés puede secuenciarse y entonces la secuencia de polinucleótidos puede clonarse en un vector para su expresión o propagación. La secuencia que codifica el 15 anticuerpo de interés puede mantenerse en vector en una célula huésped y la célula huésped entonces puede expandirse y congelarse para su uso futuro. La producción de anticuerpos monoclonales recombinantes en el cultivo celular puede llevarse a cabo a través de la clonación de genes de 20 anticuerpos a partir de células B por medios conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Tiller et al., 2008, J. Immunol. Methods 329, 112; patente de los EE. UU. No. 7,314,622.

En algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos puede utilizarse para la manipulación genética de "humanizar" el anticuerpo o mejorar la afinidad u otras características del anticuerpo. Los anticuerpos también
5 pueden personalizarse para su uso, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos.

En algunas modalidades, los anticuerpos totalmente humanos pueden obtenerse al utilizar ratones comercialmente disponibles que se han diseñado para expresar proteínas de
10 inmunoglobulina específicas. Los animales transgénicos se diseñan para producir una respuesta inmune más deseable (por ejemplo, anticuerpos totalmente humanos) o más robusta que también puede utilizarse para la generación de anticuerpos humanizados o humanos. Ejemplos de tal tecnología son
15 Xenomouse™ de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y HuMAb-Mouse® y TC Mouse™ de Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

Los anticuerpos pueden elaborarse de modo recombinante al aislar en primer lugar los anticuerpos y las células productoras de anticuerpos a partir de los animales
20 huésped, al obtener la secuencia génica y utilizar la secuencia génica para expresar el anticuerpo de modo recombinante en las células huésped (por ejemplo, células de

CHO). Otro método que puede emplearse es para expresar la secuencia de anticuerpos en plantas (por ejemplo, tabaco) o leche transgénica. Se han descrito los métodos para expresar anticuerpos de modo recombinante en plantas o leche. Ver, por
5 ejemplo, Peeters, et al. Vaccine 19:2756, 2001; Lonberg, N. y D. Huszar Int. Rev. Immunol 13:65, 1995; y Pollock, et al., J Immunol Methods 231:147, 1999. Se conocen en la técnica los métodos para elaborar derivados de anticuerpos, por ejemplo, de dominio, de cadena simple, etc.

10 También pueden emplearse técnicas de inmunoensayos de clasificación por citometría de flujo tales como la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para aislar los anticuerpos que son específicos para GITR.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se
15 aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, al utilizar sondas de oligonucleótidos que son capaces de llevar específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven
20 como una fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en los vectores de expresión (tales como los vectores de expresión descritos en la Publicación PCT No. WO

87/04462), los cuales se transfectan después en las células huésped tales como células de E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen la proteína de inmunoglobulina para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Ver, por ejemplo, Publicación PCT No. WO 87/04462. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, al sustituir la secuencia de codificación de los dominios constantes de cadenas ligera y pesada humanas en lugar de las secuencias de murino homólogas, Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851, 1984 o mediante la unión covalente de la secuencia que codifica inmunoglobulina en toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido sin inmunoglobulina. De esa manera, los anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" se preparan para que tengan la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal de G1TR de la presente.

Los fragmentos de anticuerpo pueden producirse mediante una degradación proteolítica o diferente de los anticuerpos mediante métodos recombinantes (es decir, polipéptidos simples o de fusión) como se describe anteriormente o mediante síntesis química. Los polipéptidos

de los anticuerpos, especialmente polipéptidos más cortos hasta de aproximadamente 50 aminoácidos se elaboran de modo conveniente mediante síntesis química. Los métodos de síntesis química se conocen en la técnica y están
5 comercialmente disponibles. Por ejemplo, un anticuerpo podría producirse mediante un sintetizador polipeptídico automatizado que emplea el método de fase sólida. Ver también las Patentes de los EE. UU. Nos. 5,807,715; 4,816,567; y 6,331,415.

10 En algunas modalidades, un polinucleótido comprende una secuencia que codifica las regiones variables de cadena pesada y/o de cadena ligera de los anticuerpos m3G7, h3G7VL1.1, h3G7H1, h3G7H2, h3G7AM, h3G7R5, h3G7LF, h3G7N9, m10H2, h10H2HU, h10H2AM, h10H2N13, h10H2N14, r18H12 y r21B6.
15 La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector de una célula huésped y la célula huésped entonces puede expandirse y congelarse para su uso futuro. Los vectores (incluyendo los vectores de expresión) y las células huésped se describen aún más en la presente.

20 La invención incluye modalidades de afinidad madurada. Por ejemplo, los anticuerpos de afinidad madurada pueden producirse mediante procedimientos conocidos en la

técnica (Marks et al., 1992, Bio/Technology, 10:779-783; Barbas et al., 1994, Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813; Schier et al., 1995, Gene, 169:147-155; Yelton et al., 1995, J. Immunol., 155:1994-2004; Jackson et al., 1995, J. Immunol., 154(7):3310-9; Hawkins et al., 1992, J. Mol. Biol., 226:889-896; y publicación PCT No. WO2004/058184).

Los siguientes métodos pueden utilizarse para ajustar la afinidad de un anticuerpo y para caracterizar una CDR. Una manera de caracterizar una CDR de un anticuerpo y/o

10 alterar (tal como mejorar) la afinidad de unión de un polipéptido, tal como un anticuerpo llamado "biblioteca de mutagénesis por barrido". En general, la biblioteca de mutagénesis por barrido trabaja como sigue. Una o más posiciones de aminoácidos en la CDR se reemplazan con dos o

15 más (tales como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) aminoácidos que utilizan métodos reconocidos en la técnica. Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunas modalidades, uno para cada posición de aminoácido, es decir, analizado), cada uno con una

20 complejidad de dos o más miembros (si se sustituyen dos o más aminoácidos en cada posición). En general, la biblioteca también incluye un clon que comprende el aminoácido nativo

(no sustituido). Un pequeño número de clones, por ejemplo, aproximadamente 20-80 clones (dependiendo de la complejidad de la biblioteca), de cada biblioteca se seleccionan para afinidad de unión en el polipéptido objetivo (u otro objetivo de unión) y se identifican los candidatos con unión incrementada, igual, reducida o sin unión. Los métodos para determinar la afinidad de unión se conocen bien en la técnica. La afinidad de unión puede determinarse utilizando, por ejemplo, el análisis de resonancia de plasmón de superficie Biacore™, el cual detecta diferencias en la afinidad de unión de aproximadamente 2 veces o mayor, en los ensayos de proximidad de centelleo Biosensor Kinexa, ELISA, inmunoensayo ORIGEN®, extinción por fluorescencia, transferencia por fluorescencia y/o despliegue de levaduras. La afinidad de unión también puede seleccionarse utilizando un bioensayo adecuado. Biacore™ es particularmente útil cuando el anticuerpo de partida ya se une con una afinidad relativamente alta, por ejemplo, una K_D de aproximadamente 10 nM o menor.

En algunas modalidades, se reemplaza cada posición de aminoácido en una CDR (en algunas modalidades, una a la vez) con los 20 aminoácidos naturales utilizando métodos de

mutagénesis reconocidos en la técnica (algunos de los cuales se describen en la presente). Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunas modalidades, una para cada posición de aminoácido, es decir, analizada), cada uno con
5 una complejidad de 20 miembros (si los 20 aminoácidos se sustituyen en cada posición).

En algunas modalidades, la biblioteca que se va a seleccionar comprende sustituciones en dos o más posiciones, las cuales pueden estar en la misma CDR o en dos o más CDR.
10 De este modo, la biblioteca puede comprender sustituciones en dos o más posiciones de una CDR. La biblioteca puede comprender una sustitución en dos o más posiciones de dos o más CDR. La biblioteca puede comprender la sustitución de 3, 4, 5 o más posiciones, las posiciones se encuentran en dos,
15 tres, cuatro, cinco o seis CDR. La sustitución puede prepararse utilizando codones de baja redundancia. Ver, por ejemplo, la Tabla 2 de Balint et al., 1993, Gene 137(1):109-18.

La CDR puede ser una región variable CDR3 de cadena
20 pesada (VH) y/o región variable CDR3 de cadena ligera (VL). Las CDR pueden ser una o más de CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL, y/o CDR3 VL. Las CDR pueden ser una CDR de

Kabat, una CDR de Chothia, una CDR extendida, una CDR de AbM, una CDR de contacto o una CDR conformacional.

Los candidatos con unión mejorada pueden secuenciarse al identificar de este modo una sustitución
5 mutante de CDR que resulta en una afinidad mejorada (también llamada una sustitución "mejorada"). Los candidatos que se unen también pueden secuenciarse al identificar de este modo una sustitución de CDR que mantenga la unión.

Pueden llevarse a cabo múltiples rondas de
10 selección. Por ejemplo, candidatos (cada uno comprende una sustitución de aminoácido en una o más posiciones de una o más CDR) con unión mejorada que también son útiles para el diseño de una segunda biblioteca que contiene al menos el aminoácido original y sustituido en cada posición de CDR
15 mejorada (es decir, la posición del aminoácido en la CDR en la cual una sustitución mutante muestra una unión mejorada). La preparación y detección o selección de esta biblioteca se discute aún más a continuación.

La biblioteca de mutagénesis por barrido también
20 proporciona un medio para caracterizar una CDR, a medida que la frecuencia de clones con unión mejorada, la misma unión, unión reducida o sin unión también proporciona información

relacionada con la importancia de cada posición de aminoácido para la estabilidad del complejo anticuerpo-antígeno. Por ejemplo, si una posición de la CDR mantiene la unión cuando cambian los 20 aminoácidos, esa posición se identifica como una posición, es decir, improbable que se requiera para la unión al antígeno. De modo inverso, si una posición de CDR solo mantiene la unión en un pequeño porcentaje de sustituciones, esa posición se identifica como una posición, es decir, importante para la función de CDR. De este modo, la biblioteca de los métodos de mutagénesis por barrido genera información con respecto a las posiciones en las CDR que pueden cambiarse a muchos aminoácidos diferentes (incluyendo los 20 aminoácidos) y posiciones en las CDR que no pueden cambiarse o que sólo pueden cambiarse a pocos aminoácidos.

Los candidatos con afinidad mejorada pueden combinarse en una segunda biblioteca que incluye los aminoácidos mejorado, el aminoácido original en esa posición y además puede incluir sustituciones adicionales en esa posición dependiendo de la complejidad de la biblioteca, es decir, deseada o permitida utilizando el método de detección o selección deseada. Además, si se desea, la posición del aminoácido adyacente puede aleatorizarse al menos a dos o más

aminoácidos. La aleatorización de los aminoácidos adyacentes puede permitir una flexibilidad conformacional adicional en la CDR mutante, que a su vez permite o facilita la introducción de una cantidad grande de mutaciones mejoradas.

5 La biblioteca también puede comprender una sustitución en las posiciones que no muestran una afinidad mejorada en la primera ronda de selección.

La segunda biblioteca se detecta o selecciona para miembros de biblioteca con afinidad de unión mejorada y/o alterada utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo la selección al utilizar el análisis biosensor Kinexa™ y la selección utilizando cualquier método conocido en la técnica para su selección, incluyendo el despliegue de fagos, despliegue de levaduras y despliegue de ribosomas.

15 Para expresar los anticuerpos anti-GITR de la presente invención, los fragmentos de ADN que codifican las regiones de VH y VL pueden obtenerse en primer lugar al utilizar cualquiera de los métodos descritos anteriormente. También pueden introducirse diversas modificaciones, por ejemplo, mutaciones, supresiones y/o adiciones en las
20 secuencias de ADN utilizando métodos estándar conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. Por ejemplo, la

mutagénesis puede llevarse a cabo utilizando métodos estándar tales como mutagénesis mediada por PCR, en la cual los nucleótidos mutados se incorporan en los cebadores de PCR de modo que el producto de PCR contenga las mutaciones deseadas
5 o mutagénesis dirigida al sitio.

La invención abarca modificaciones de las regiones variables mostradas en la Tabla 1 y las CDR mostradas en las Tablas 2, 3 o 4. Por ejemplo, la invención incluye anticuerpos que comprenden regiones variables funcionalmente
10 equivalentes y las CDR que no afecten significativamente sus propiedades, así como variantes que tienen una actividad y/o afinidad intensificada o reducida. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos puede hacerse mutar para obtener un anticuerpo con la afinidad de unión deseada a GITR. La modificación de
15 polipéptidos es práctica de rutina en la técnica y no necesita describirse en detalle en la presente. Ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos, una o más supresiones o adiciones de aminoácidos que no cambian de
20 modo significativamente perjudicial la actividad funcional o que madura (intensifica) la afinidad del polipéptido por su ligando o uso de análogos químicos.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo terminales que oscilan en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos simples o múltiples. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a un epítipo marcador. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al N- o C-término del anticuerpo de una enzima o un polipéptido que incrementa la vida media del anticuerpo en la circulación sanguínea.

Las variantes de sustitución tienen al menos un residuo de aminoácidos en la molécula de anticuerpo eliminada y un residuo diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones del marco. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 5 bajo el encabezado de "sustituciones conservadoras." Si tales sustituciones resultan en un cambio de actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 5 o como se describe además a continuación con

referencia a las clases de aminoácidos, pueden introducirse y los productos seleccionarse.

Tabla 5: Sustituciones de aminoácidos

5	Residuo original	Sustituciones conservadoras	Sustituciones ejemplares
	Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
	Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
	Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
	Asp (D)	Glu	Glu; Asn
	Cys (C)	Ser	Ser; Ala
10	Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
	Glu (E)	Asp	Asp; Gln
	Gly (G)	Ala	Ala
	His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
	Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
	Leu (L)	Ile	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
	Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
15	Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
	Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
	Pro (P)	Ala	Ala
	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
	Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
20	Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se logran al seleccionar sustituciones que difieran significativamente en su efecto de

mantener (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hoja β o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo o (c) el
5 volumen de la cadena lateral. Los residuos de origen natural se dividen en grupos con base en las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) No polar: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) Polar sin carga: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 10 (3) Ácida (cargada de forma negativa): Asp, Glu;
- (4) Básica (cargada de forma positiva): Lys, Arg;
- (5) Residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- (6) Aromática: Trp, Tyr, Phe, His.

15 Las sustituciones no conservadoras se hacen al intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de sustitución que puede hacerse, por ejemplo, es cambiar una o más cisteínas del anticuerpo, las
20 cuales pueden ser químicamente reactivas en otro residuo, tal como sin limitación, alanina o serina. Por ejemplo, puede haber una sustitución de cisteína no canónica. La sustitución

puede hacerse en una CDR o región de marco de un dominio variable o en la región constante de un anticuerpo. En algunas modalidades, la cisteína es canónica. También puede sustituirse cualquier residuo de cisteína que no está
5 implicada en mantener la conformación apropiada del anticuerpo, en general con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. De modo inverso, las uniones de cisteína pueden agregarse al anticuerpo para mejorar su estabilidad, en
10 particular cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv.

Los anticuerpos también pueden modificarse, por ejemplo, en los dominios variables de las cadenas pesada y/o ligera, por ejemplo, al alterar una propiedad de unión del
15 anticuerpo. Los cambios en la región variable pueden alterar la afinidad y/o especificidad de unión. En algunas modalidades, no se hacen más de una a cinco sustituciones de aminoácidos conservadoras dentro de un dominio de CDR. En otras modalidades, no se hacen más de una a tres
20 sustituciones de aminoácidos conservadoras dentro de un dominio de CDR. Por ejemplo, puede hacerse una mutación en una o más de las regiones de CDR para incrementar o reducir

K_D del anticuerpo para GITR, incrementar o reducir k_{off} o alterar la especificidad de unión del anticuerpo. Las técnicas de mutagénesis dirigidas al sitio son bien conocidas en el arte. Ver, por ejemplo, Sambrook et al. Y Ausubel et al., *supra*.

También puede hacerse una modificación o mutación en una región de marco o región constante para incrementar la vida media de un anticuerpo anti-GITR. Ver, por ejemplo, Publicación de PCT No. WO 00/09560. También puede hacerse una mutación en una región de marco o región constante para alterar la inmunogenicidad del anticuerpo, proveer un sitio de unión covalente o no covalente a otra molécula o alterar tales propiedades como fijación del complemento, unión FcR y citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo. En algunas modalidades, no se hacen más de una a cinco sustituciones de aminoácidos conservadoras dentro de la región de marco o región constante. En otras modalidades, no se hacen más de una a tres sustituciones de aminoácidos conservadoras dentro de la región de marco o región constante. De acuerdo con la invención, un solo anticuerpo puede tener mutaciones en cualquiera de una o más de las CDR

o regiones de marco del dominio variable o en la región constante.

Las modificaciones también incluyen polipéptidos glicosilados y no glicosilados, así como polipéptidos con
5 otras modificaciones post-traductorales, tales como, por ejemplo, glicosilación, acetilación y fosforilación con diferentes azúcares. Los anticuerpos se glicosilan en las posiciones conservadas de sus regiones constantes (Jefferis y Lund, 1997, Chem. Immunol. 65:111-128; Wright y Morrison,
10 1997, TibTECH 15:26-32). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan la función de las proteínas (Boyd et al., 1996, Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwe y Howard, 1990, Biochem. 29:4175-4180) y la interacción intramolecular entre porciones de la
15 glicoproteína, que puede afectar la conformación y superficie tridimensional presentada de la glicoproteína (Jefferis y Lund, supra; Wyss y Wagner, 1996, Current Opin. Biotech. 7:409-416). Los oligosacáridos también pueden servir para dirigir una glicoproteína dada a ciertas moléculas basadas en
20 las estructuras de reconocimiento específicas. También se ha reportado que la glicosilación de anticuerpos afecta la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). En

particular, los anticuerpos producidos por células de CHO con la expresión de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII) regulada de tetraciclina de una glicosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc de disección, se reportó
5 que tuvieron una actividad ADCC mejorada (Umana et al., 1999, Nature Biotech. 17:176-180).

La glicosilación de anticuerpos es normalmente ya sea N-enlazada u O-enlazada. N-enlazada se refiere a la unión de la porción carbohidrato a la cadena lateral de un residuo
10 de asparagina. Las secuencias tripeptídicas de asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina y asparagina-X-cisteína, donde X es un aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento de la unión enzimática de la porción carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De este modo,
15 la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación O-enlazada se refiere a la unión de uno de los azúcares de N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxil aminoácido, más comúnmente serina o treonina,
20 aunque también puede utilizarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra de modo conveniente al alterar la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para los sitios de glicosilación N-enlazados). La alteración también puede hacerse mediante la adición de o sustitución por uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de glicosilación O-enlazados).

El patrón de glicosilación de los anticuerpos también puede alterarse sin alterar la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende en gran medida de las células huésped utilizadas para expresar el anticuerpo. Puesto que el tipo celular utilizado para la expresión de glicoproteínas recombinantes, por ejemplo, anticuerpos, como un terapéutico potencial raramente es la célula nativa, pueden esperarse variaciones del patrón de glicosilación de los anticuerpos (ver, por ejemplo, Hse et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:9062-9070).

Además de la elección de células huésped, los factores que afectan la glicosilación durante la producción recombinante de los anticuerpos incluyen el modo de crecimiento, formulación media, densidad del cultivo,

oxigenación, pH, esquemas de purificación y similares. Se han
propuesto diversos métodos para alterar el patrón de
glicosilación logrado en un organismo huésped particular
incluyendo introducir o sobreexpresar ciertas enzimas
5 implicadas en la producción de oligosacáridos (Patentes de
los EE. UU. Nos. 5,047,335; 5,510,261 y 5,278,299). La
glicosilación o ciertos tipos de glicosilación, pueden
retirarse enzimáticamente de la glicoproteína, por ejemplo,
utilizando la endoglicosidasa H (Endo H), N-glicosidasa F,
10 endoglicosidasa F1, endoglicosidasa F2, endoglicosidasa F3.
Además, la célula huésped recombinante puede diseñarse
genéticamente por ser defectuosa al procesar ciertos tipos de
polisacáridos. Estas y técnicas similares se conocen bien en
la técnica.

15 Otros métodos de modificación incluyen utilizar
técnicas de acoplamiento conocidas en el arte, que incluyen,
pero no se limitan a medios enzimáticos, sustitución
oxidativa y quelación. Pueden utilizarse modificaciones, por
ejemplo, para la unión de marcadores de inmunoensayo. Los
20 polipéptidos modificados se hacen utilizando procedimientos
establecidos en la técnica y pueden seleccionarse utilizando

ensayos estándar conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen a continuación y en los Ejemplos.

En algunas modalidades, la Fc puede ser IgG₁ humana. En algunas modalidades, la región constante tiene la
5 secuencia mostrada en SEQ ID NO: 129.

En algunas modalidades, la Fc puede ser IgG₂ humana o IgG₄ humana. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de IgG₄ que comprende las siguientes mutaciones (Armour et al., 2003, Molecular
10 Immunology 40 585-593): de E233F234L235 a P233V234A235 (IgG_{4Δc}), en las cuales la numeración es con referencia a la IgG₄ de tipo silvestre. Incluso en otra modalidad, la Fc es IgG₄ humana de E233F234L235 a P233V234A235 con supresión de G236 (IgG_{4Δb}). En algunas modalidades, la Fc es cualquier Fc
15 de IgG₄ (IgG₄, IgG_{4Δb} o IgG_{4Δc}) que contenga una mutación de S228 a P228 de estabilización de la bisagra (Aalberse et al., 2002, Immunology 105, 9-19). En otras modalidades, la Fc puede ser IgG₂ humana que contenga la mutación de A330P331 a S330S331 (IgG_{2Δa}), e la cual los residuos de aminoácidos se
20 numeran con referencia a la secuencia de IgG₂ de tipo silvestre. Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante modificada que tiene una afinidad de unión incrementada o reducida a un receptor gamma Fc humano, es inmunológicamente inerte o parcialmente inerte, por ejemplo, no desencadena una lisis mediada por complemento, no estimula la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC) o no activa la microglia; o tiene actividades reducidas (comparadas con el anticuerpo no modificado) en cualquiera de uno o más de los siguientes:

desencadenar la lisis mediada por complemento, estimular ADCC o activar la microglia. Pueden utilizarse diferentes modificaciones de la región constante para lograr un nivel óptimo y/o combinación de las funciones efectoras. Ver, por ejemplo, Morgan et al., Immunology 86:319-324, 1995; Lund et al., J. Immunology 157:4963-9 157:4963-4969, 1996; Idusogie et al., J. Immunology 164:4178-4184, 2000; Tao et al., J. Immunology 143: 2595-2601, 1989; y Jefferis et al., Immunological Reviews 163:59-76, 1998. En algunas modalidades, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624; Publicación de PCT No. WO99/058572.

En algunas modalidades, una región constante de anticuerpo puede modificarse para evitar la interacción con el receptor Fc gamma y el complemento y los sistemas inmunes. Las técnicas para la preparación de tales anticuerpos se describen en WO 99/58572. Por ejemplo, la región constante puede diseñarse para parecerse más a las regiones constantes humanas para evitar una respuesta inmune si el anticuerpo se utiliza en ensayos y tratamientos clínicos en humanos. Ver, por ejemplo, Patentes de los EE. UU. Nos. 5,997,867 y 5,866,692.

Incluso en otras modalidades, la región constante está aglicosilada para la glicosilación N-enlazada. En algunas modalidades, la región constante está aglicosilada para la glicosilación N-enlazada al hacer mutar el residuo de unión al oligosacárido y/o residuos flanqueantes que son parte de la secuencia de reconocimiento de la N-glicosilación en la región constante. Por ejemplo, el sitio N297 de la N-glicosilación puede hacerse mutar a, por ejemplo, A, Q, K o H. Ver, Tao et al., J. Immunology 143: 2595-2601, 1989; y Jefferis et al., Immunological Reviews 163:59-76, 1998. En algunas modalidades, la región constante está aglicosilada para la glicosilación N-enlazada. La región constante puede

aglicosilarse enzimáticamente para la glicosilación N-enlazada (tal como al retirar el carbohidrato por la enzima PNGasa) o mediante la expresión en una célula huésped deficiente en glicosilación.

5 Otras modificaciones de anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado como se describe en la Publicación PCT No. WO 99/58572. Estos anticuerpos comprenden, además de un dominio de unión dirigido a la molécula objetivo, un dominio efector que tiene una secuencia
10 de aminoácidos sustancialmente homóloga en todo o parte de una región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos son capaces de unirse a la molécula objetivo sin desencadenar una lisis significativa dependiente del complemento o destrucción del objetivo mediada por
15 células. En algunas modalidades, el dominio efector es capaz de unirse específicamente a FcRn y/o FcγRIIb. Estos se basan normalmente en dominios quiméricos derivados de dos o más dominios CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos modificados de esta manera son adecuados en
20 particular para su uso en la terapia crónica con anticuerpos para evitar reacciones inflamatorias y otras adversas a la terapia de anticuerpos convencional.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante modificada que tiene una afinidad de unión incrementada para FcRn y/o una vida media en suero incrementada cuando se compara con el anticuerpo sin
5 modificar.

En un proceso conocido como "humanización", ciertos aminoácidos de las secuencias de VH y VL pueden hacerse mutar para coincidir con las de origen natural en las secuencias de la línea germinal de VH y VL. En particular, las secuencias
10 de aminoácidos de las regiones de marco en las secuencias de VH y VL pueden hacerse mutar para coincidir con las secuencias de la línea germinal para reducir el riesgo de inmunogenicidad cuando se administra el anticuerpo. Las secuencias de ADN de la línea germinal para los genes de VH y
15 VL humano se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, la base de datos de la secuencia de la línea germinal humana "Vbase"; ver también Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242;
20 Tomlinson et al., 1992, J. Mol. Biol. 227:776-798; y Cox et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:827-836).

Otro tipo de sustitución de aminoácidos que puede hacerse es retirar los sitios proteolíticos potenciales en el anticuerpo. Tales sitios pueden aparecer en una CDR o región de marco de un dominio variable o en la región constante de un anticuerpo. La sustitución de residuos de cisteína y el retiro de sitios proteolíticos pueden reducir el riesgo de heterogeneidad en el producto de anticuerpo y de este modo incrementar su homogeneidad. Otro tipo de sustitución de aminoácidos es para eliminar los pares de asparagina-glicina que forman los sitios de desamidación potencial al alterar uno o ambos residuos. En otro ejemplo, puede escindirse la lisina C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo anti-GITR de la invención. En diversas modalidades de la invención, las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos anti-GITR pueden incluir opcionalmente una secuencia de señal.

Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos de VH y VL de la presente invención, estos fragmentos de ADN además pueden manipularse mediante técnicas estándar de ADN recombinante, por ejemplo, convertir los genes de la región variable a los genes de la cadena de anticuerpos de longitud completa, a los genes del fragmento

Fab o a un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH se enlaza de modo operativo a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. Como
5 se utiliza en este contexto, el término "enlazado de modo operativo", pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen de modo que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco.

El ADN aislado que codifica la región VH puede
10 convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa al enlazar de modo operativo el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Se conocen en la técnica las secuencias de los genes humanos de región constante de cadena
15 pesada (ver, por ejemplo, Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante la amplificación de
20 PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgE, IgM o IgD, pero de mayor preferencia es una región constante de

IgG₁ o IgG₂. La secuencia de región constante de IgG puede ser cualquiera de los diversos alelos o alotipos que se sabe aparecen entre individuos diferentes, tales como Gm(1), Gm(2), Gm(3) y Gm(17). Estos alotipos representan la
5 sustitución de aminoácidos de origen natural en las regiones constantes de IgG1. Para un gen de cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica VH puede enlazarse de modo operativo a otra molécula de ADN que sólo codifica la región constante CH1 de cadena pesada. La región constante CH1 de
10 cadena pesada puede derivarse a partir de cualquiera de los genes de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen Fab de cadena ligera) al enlazar de modo
15 operativo el ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de región constante de cadena ligera humanos se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological
20 Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante la

amplificación de PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda. La región constante kappa puede ser cualquiera de los diversos alelos conocidos que aparecen entre diferentes individuos, tales como Inv(1), Inv(2) e Inv(3). La región constante lambda puede derivarse de cualquiera de los tres genes lambda.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se enlazan de modo operativo a otro fragmento que codifica un enlazador flexible de modo que las secuencias de VH y VL puedan expresarse como una proteína contigua de cadena simple, con las regiones VL y VH unidas por el enlazador flexible (ver, por ejemplo, Bird et al., 1988, Science 242:423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554. Un ejemplo de un enlace peptídico es (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 130), el cual puentea aproximadamente 3.5 nm entre el término carboxi de una región variable y el término amino de la otra región variable. Se han designado y utilizado enlazadores de otras secuencias (Bird et al., 1988, supra). Los enlazadores a su vez se modifican para funciones adicionales, tales como la unión de fármacos o la unión a

soportes sólidos. El anticuerpo de cadena simple puede ser monovalente, si solo se utiliza una VH y VL simple bivalente, si se utilizan dos VH y VL o son polivalentes, si se utilizan más de dos VH y VL. Pueden generarse anticuerpos

5 bienespecíficos o polivalentes que se unan específicamente a GITR y a otra molécula. Las variantes de cadena simple pueden producirse ya sea de forma recombinante o sintética. Para la producción sintética de scFv puede utilizarse un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de scFv, un

10 plásmido adecuado que contiene el polinucleótido que codifica la scFv puede introducirse en una célula huésped adecuada, ya sea células eucarióticas, tales como células de levadura, vegetales, de insecto o de mamíferos o procarióticas, tales como *E. coli*. Los polinucleótidos que codifican la scFv de

15 interés pueden hacerse mediante manipulaciones de rutina tales como la ligación de polinucleótidos. La scFv resultante puede aislarse utilizando técnicas estándar de purificación de proteínas conocidas en el arte.

También se abarcan otras formas de anticuerpos de

20 cadena simple, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bienespecíficos bivalentes, en los cuales las VH y VL se expresan en una cadena de polipéptidos simple, pero

utilizan un enlazador, es decir, demasiado corto para permitir el pareado entre los dos dominios de la misma cadena, forzando de este modo que los dos dominios se apareen con dominios complementarios de otra cadena y creen dos
5 sitios de unión al antígeno (ver, por ejemplo, Holliger, P., et al., 1993, Proc. Natl. Acad Sci. EE. UU. 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al., 1994, Structure 2:1121-1123).

Los anticuerpos heteroconjugados que comprenden dos anticuerpos unidos de forma covalente también están dentro
10 del alcance de la invención. Tales anticuerpos se han utilizado para dirigir las células del sistema inmunes a las células indeseadas (Patente de los EE. UU. No. 4,676,980) y para el tratamiento contra la infección por VIH (Publicaciones de PCT Nos. WO91/00360 y WO92/200373; EP
15 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden elaborarse utilizando métodos de reticulación convenientes. Los agentes y técnicas de reticulación adecuadas se conocen bien en el arte y se describen en la Patente de EE. UU. No. 4,676,980.

Los anticuerpos quiméricos o híbridos también
20 pueden prepararse *in vitro* utilizando métodos conocidos de química proteica sintética, incluyendo aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas

pueden construirse utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o al formar un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen el iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

5 La invención también abarca fusión de proteínas que comprenden uno o más fragmentos o regiones de los anticuerpos descritos en la presente. En algunas modalidades, puede elaborarse un anticuerpo de fusión que comprende todo o una porción de un anticuerpo anti-GITR de la invención enlazado a
10 otro polipéptido. En otra modalidad, solo se enlazan los dominios variables del anticuerpo anti-GITR al polipéptido. En otra modalidad, el dominio de VH de un anticuerpo anti-GITR se enlaza a un primer polipéptido, mientras que el dominio de VL de un anticuerpo anti-GITR se enlaza a un
15 segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido de una manera tal que los dominios de VH y VL puedan interactuar entre sí para formar un sitio de unión al antígeno. En otra modalidad preferida, el dominio de VH se separa del dominio de VL por un enlazador de modo que los
20 dominios de VH y VL puedan interactuar entre sí. El anticuerpo de VH enlazador de VL entonces se enlaza con el polipéptido de interés. Además, los anticuerpos de fusión

pueden crearse en los cuales dos (o más) anticuerpos de cadena simple se enlazan entre sí. Esto es útil si uno busca crear un anticuerpo divalente o polivalente en una cadena de polipéptidos simple o si uno busca crear un anticuerpo
5 biespecífico.

En algunas modalidades, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la región variable de cadena ligera mostrada en las SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 111, 120,
10 122, 69 o 71, y/o al menos 10 aminoácidos de la región variable de cadena pesada mostrada en las SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 70, 72, 112, 121 o 123. En otras modalidades, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos aproximadamente 10, al menos
15 aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25 o al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la región variable de cadena ligera y/o al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25 o al menos
20 aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la región variable de cadena pesada. En otra modalidad, el polipéptido de fusión comprende una región variable de cadena ligera y/o

una región variable de cadena pesada, como se muestra en cualquiera de los pares de secuencias seleccionados de entre SEQ ID NOs: 1 y 2, 3 y 4, 5 y 6, 7 y 8, 9 y 10, 11 y 12, 13 y 14, 111 y 112, 15 y 16, 17 y 18, 19 y 20, 120 y 121, 122 y 123, 69 y 70 o 71 y 72. En otra modalidad, el polipéptido de fusión comprende una o más CDR. Incluso en otras modalidades, el polipéptido de fusión comprende CDR3 VH y/o CDR3 VL. Para propósitos de esta invención, una proteína de fusión contiene uno o más anticuerpos y otra secuencia de aminoácidos a la cual no se unen en la molécula nativa, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga de otra región. Secuencias heterólogas ejemplares incluyen, pero no se limitan a un "marcador" tal como un marcador FLAG o un marcador 6His. Los marcadores se conocen bien en la técnica.

Un polipéptido de fusión puede crearse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, de forma sintética o recombinante. Normalmente, la fusión de proteínas de esta invención se hace al preparar y expresar un polinucleótido que las codifica utilizando los métodos recombinantes descritos en la presente, aunque también pueden prepararse por otros medios conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la síntesis química.

En otras modalidades, otros anticuerpos modificados pueden prepararse utilizando moléculas de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo anti-GITR. Por ejemplo, los "cuerpos Kappa" (III et al., 1997, Protein Eng. 10:949-57),
5 "Minicuerpos" (Martin et al., 1994, EMBO J. 13:5303-9),
"Diacuerpos" (Holliger et al., supra) o "Janusinos" (Traunecker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659 y Traunecker et al., 1992, Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52) pueden prepararse utilizando técnicas estándar de biología molecular
10 siguiendo las enseñanzas de la especificación.

Por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes, pueden prepararse utilizando los anticuerpos descritos en la presente. Los métodos para
15 elaborar anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Suresh et al., 1986, Methods in Enzymology 121:210). Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión al antígeno pueden producirse mediante la fusión de hibridomas o enlace de fragmentos Fab'. Ver, por
20 ejemplo, Songsivilai y Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321, Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553. De modo tradicional, la producción recombinante de

anticuerpos biespecíficos se basó en la coexpresión de dos pares de cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina, con las dos cadenas pesadas teniendo especificidades diferentes (Millstein y Cuello, 1983, Nature 305, 537-539).

5 Además, los anticuerpos biespecíficos pueden formarse como "diacuerpos" o "Janusinos." En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se une a dos epítomos diferentes de GITR. En algunas modalidades, los anticuerpos modificados descritos anteriormente se preparan utilizando uno o más de
10 los dominios variables o regiones CDR a partir de un anticuerpo anti-GITR proporcionado en la presente.

De acuerdo con un procedimiento para elaborar anticuerpos biespecíficos, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios
15 que combinan anticuerpo-antígeno) se fusionan a las secuencias de región constante de inmunoglobulina. La fusión de preferencia es con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones de bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera
20 región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para unir la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la

cadena pesada de inmunoglobulina y si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se co-transfectan en un organismo huésped apropiado. Esto se proporciona para una mayor
5 flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en modalidades cuando las relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de
10 codificación para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales resulta en altos rendimientos o cuando las relaciones no son de significancia particular.

15 En un procedimiento, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el
20 otro brazo. Esta estructura asimétrica con una cadena ligera de inmunoglobulina sólo en una mitad de la molécula biespecífica, facilita la separación del compuesto

biespecífico deseado de las combinaciones de la cadena de inmunoglobulina no deseadas. Este procedimiento se describe en la Publicación de PCT No. WO 94/04690.

En otro procedimiento, los anticuerpos
5 biespecíficos se componen de la modificación de aminoácidos en la primera región de bisagra en un brazo y el aminoácido sustituido/reemplazado en la primera región de bisagra tiene una carga opuesta al aminoácido correspondiente de la segunda región de bisagra en el otro brazo. Este procedimiento se
10 describe en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2011/036419 (WO2011/143545). En algunas modalidades, la formación de los anticuerpos biespecíficos se intensifica al alterar o diseñar una interconexión entre una primera y una segunda región Fc (por ejemplo, una región de bisagra y una
15 región CH3). En este procedimiento, los anticuerpos biespecíficos pueden componerse de una región CH3, en donde la región CH3 comprende un primer polipéptido CH3 y un segundo polipéptido CH3 que interactúan juntos para formar una interconexión CH3, en donde uno o más aminoácidos dentro
20 de la interconexión CH3 desestabiliza la formación del homodímero (por ejemplo, anticuerpo monoespecífico). Ver, por ejemplo, PCT/US2011/036419 (WO2011/143545).

En otro procedimiento, los anticuerpos biespecíficos pueden generarse utilizando un marcador peptídico que contenga glutamina diseñada para el anticuerpo dirigido a un epítipo (por ejemplo, GITR) en un brazo y otro
5 marcador peptídico (por ejemplo, un marcador peptídico que contiene Lys o una Lys endógena reactiva) diseñada para un segundo anticuerpo dirigido a un segundo epítipo en otro brazo en presencia de transglutaminasa. Este procedimiento se describe en la Solicitud de Patente Internacional No.
10 PCT/IB2011/054899 (WO2012/059882).

Esta invención también proporciona composiciones que comprenden anticuerpos conjugados (por ejemplo, enlazados) a un agente que facilite el acoplamiento a un soporte sólido (tal como biotina o avidina). Por simplicidad,
15 se hará referencia en general a los anticuerpos con el entendimiento de que estos métodos aplican a cualquiera de las modalidades de unión a GITR descritas en la presente. La conjugación en general se refiere a enlazar estos componentes como se describe en la presente. El enlace (que fija en
20 general estos componentes en asociación próxima al menos para su administración) puede lograrse de cualquier número de maneras. Por ejemplo, es posible una reacción directa entre

un agente y un anticuerpo cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleofílico, tal como un grupo amino o sulfhidrilo, en uno que pueda ser capaz de reaccionar con un grupo que
5 contiene carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro ácido o con un grupo alquilo que contenga un buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro) en el otro.

Los anticuerpos pueden unirse a muchos portadores diferentes. Los portadores pueden ser activos y/o inertes.
10 Ejemplos de portadores bien conocidos incluyen polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, vidrio, celulosas natural y modificada, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del portador puede ser ya sea soluble o insoluble para propósitos de la invención. Aquellos
15 con experiencia en la técnica sabrán de otros portadores adecuados para unir los anticuerpos o serán capaces de determinar tales utilizando la experimentación de rutina. En algunas modalidades, el portador comprende una porción que se dirige al pulmón, corazón o válvulas cardíacas.

20 Un anticuerpo o polipéptido de esta invención puede enlazarse a un agente de etiquetado tal como una molécula fluorescente, una molécula radioactiva o cualesquier otras

etiquetas conocidas en la técnica. Las etiquetas se conocen en la técnica que en general proporcionan una señal (ya sea de forma directa o indirecta).

5 Polinucleótidos, vectores y células huésped

La invención también proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpo y anticuerpos modificados descritos en la presente. En otro aspecto, la invención proporciona un
10 método para elaborar cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente. Los polinucleótidos pueden elaborarse y expresarse mediante los procedimientos conocidos en la técnica. En consecuencia, en algunas modalidades, la invención proporciona polinucleótidos (o composiciones,
15 incluyendo composiciones farmacéuticas), que comprenden polinucleótidos que codifican cualquiera de los siguientes: m3G7, h3G7VL1.1, h3G7H1, h3G7H2, h3G7AM, h3G7R5, h3G7LF, h3G7N9, m10H2, h10H2HU, h10H2AM, h10H2N13, h10H2N14, r18H12, r21B6 o cualquier fragmento o parte del mismo que tenga la
20 capacidad de unirse a GITR.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones (tales como una composición farmacéutica) que

comprenden cualquiera de los polinucleótidos de la invención. En algunas modalidades, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente. En
5 todavía otras modalidades, la composición comprende cualquiera o ambos de los polinucleótidos mostrados en SEQ ID NOS: 88 y 89; SEQ ID NOS: 90 y 91; SEQ ID NOS: 92 y 93; SEQ ID NOS: 94 y 95; SEQ ID NOS: 96 y 97; SEQ ID NOS: 98 y 99; SEQ ID NOS: 100 y 101; SEQ ID NOS: 102 y 103; SEQ ID NOS: 104
10 y 105; SEQ ID NOS: 106 y 107; SEQ ID NOS: 118 y 119; SEQ ID NOS: 125 y 126; SEQ ID NOS: 127 y 128.

Los polinucleótidos complementarios a cualquiera de tales secuencias también se abarcan por la presente invención. Los polinucleótidos pueden ser de hebra simple (de
15 codificación o antisentido) o de doble hebra y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de ARNnH, que contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN de una manera de uno a uno y moléculas de ARNm, las cuales no contienen
20 intrones. Las secuencias de codificación adicional o sin codificación pueden, pero no necesariamente están presentes dentro de un polinucleótido de la presente invención y un

polinucleótido puede, pero no necesariamente enlazarse a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un anticuerpo o un fragmento del mismo) o puede comprender una variante de tal secuencia. Las variantes de polinucleótidos contienen una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones de modo que no se reduzca la inmuno-reactividad del polipéptido codificado, en relación a una molécula inmuno-reactiva nativa. El efecto sobre la inmuno-reactividad del polipéptido codificado puede evaluarse en general como se describe en la presente. De preferencia, las variantes muestran al menos aproximadamente 70% de identidad, de mayor preferencia, al menos aproximadamente 80% de identidad, incluso de mayor preferencia, al menos aproximadamente 90% de identidad y de mayor preferencia, al menos aproximadamente 95% de identidad para una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo nativo o un fragmento del mismo.

Se dice que dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de las dos secuencias es la misma cuando se alinean para una máxima correspondencia como se describe a

continuación. Las comparaciones entre dos secuencias se realizan normalmente al comparar las secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar las regiones locales de similaridad de secuencias. Como se
5 utiliza en la presente, una "ventana de comparación" se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, normalmente de 30 a aproximadamente 75 o de 40 a aproximadamente 50, en la cual puede compararse una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de
10 posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén alineadas de forma óptima.

La alineación óptima de las secuencias para comparación puede llevarse a cabo utilizando el programa MegAlign[®] del paquete de software Lasergene[®] de bioinformática
15 (DNASTAR[®], Inc., Madison, WI), utilizando parámetros predeterminados. Este programa incorpora diversos esquemas de alineación descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National
20 Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment

y Phylogenesis pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. y Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105;
 5 Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. y Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 80:726-730.

10 De preferencia, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina al comparar dos secuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en donde la porción de la secuencia de polinucleótidos o polipéptidos en la ventana de comparación
 15 puede comprender adiciones o supresiones (es decir, espacios) de 20 por ciento o menos, normalmente de 5 al 15 por ciento o de 10 al 12 por ciento, cuando se compara con las secuencias de referencia (las cuales no comprenden adiciones o supresiones) para una alineación óptima de las dos
 20 secuencias. El porcentaje se calcula al determinar el número de posiciones en las cuales las bases de ácidos nucleicos o residuos de aminoácidos idénticos aparecen en ambas

secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, al dividir el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicar
5 los resultados por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencias.

Las variantes también pueden o alternativamente, ser sustancialmente homólogas a un gen nativo o una porción o complemento del mismo. Tales variantes de polinucleótidos son
10 capaces de hibridarse bajo condiciones moderadamente rigurosas a una secuencia de ADN de origen natural que codifica un anticuerpo nativo (o una secuencia complementaria).

Las "condiciones moderadamente rigurosas" adecuadas
15 incluyen lavar previamente en una solución de 5 X SSC, SDS al 0.5%, EDTA 1.0 mM (pH 8.0); hibridar a 50°C-65°C, 5 X SSC, durante la noche, seguido por lavar dos veces a 65°C durante 20 minutos con cada una de 2X, 0.5X y 0.2X SSC que contiene SDS al 0.1 %.

20 Como se utiliza en la presente, las "condiciones altamente rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad" son aquellas que: (1) emplean una baja fuerza iónica y alta

temperatura de lavado, por ejemplo cloruro de sodio 0.015 M /cittrato de sodio 0.0015 M/dodecil sulfato de sodio al 0.1% a 50°C; (2) emplear durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como forma mida, por ejemplo, forma mida al 50% (v/v) con albúmina de suero de bovino al 0.1% /Ficoll al 0.1%/polivinilpirrolidona al 0.1%/amortiguador de fosfato de sodio 50 mM a pH 6.5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C; o (3) emplear forma mida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0.75 M, citrato de sodio 0.075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6.8), pirofosfato de sodio al 0.1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al 0.1% y sulfato de dextrano al 10% da 42°C, con lavados a 42°C en 0.2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y forma mida al 50% a 55°C, seguidos por un lavado de alta rigurosidad que consiste de 0.1 x SSC que contiene EDTA a 55°C. El técnico experimentado reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc., como sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

Se apreciará por aquellos con experiencia ordinaria en la técnica que como resultado de la degeneración del código genético existen muchas secuencias de nucleótidos que

codifican un polipéptido como se describe en la presente. Algunos de estos polinucleótidos llevan una homología mínima de la secuencia de nucleótidos de cualquier gene nativo. Sin embargo, los polinucleótidos que varían debido a las
5 diferencias en la utilidad del codón se contemplan específicamente por la presente invención. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en la presente están dentro del alcance de la presente invención. Los alelos son genes endógenos que se
10 alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como supresiones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y proteína resultante pueden, pero no necesariamente, tener una estructura o función alterada. Los alelos pueden identificarse utilizando técnicas estándar (tales como
15 hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias en bases de datos).

Los polinucleótidos de esta invención pueden obtenerse utilizando la síntesis química, métodos recombinantes o PCR. Los métodos de síntesis química de
20 polinucleótidos se conocen bien en la técnica y no necesitan describirse en detalle en la presente. Aquel con experiencia en la técnica puede utilizar las secuencias proporcionadas en

la presente y un sintetizador de ADN comercial para producir una secuencia de ADN deseada.

Para preparar polinucleótidos utilizando métodos recombinantes, puede insertarse un polinucleótido que
5 comprenda una secuencia deseada en un vector adecuado y el vector a su vez puede introducirse en una célula huésped adecuada para su replicación y amplificación, como se discute además en la presente. Los polinucleótidos pueden insertarse en las células huésped por cualesquier medios conocidos en la
10 técnica. Las células se transforman al introducir un polinucleótido exógeno mediante captación directa, endocitosis, transfección, apareamiento F o electroporación. Una vez introducido, el polinucleótido exógeno puede mantenerse dentro de la célula como un vector no integrado
15 (tal como un plásmido) o se integra en el genoma de la célula huésped. El polinucleótido amplificado de este modo puede aislarse de la célula huésped mediante métodos bien conocidos dentro de la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989.

20 Alternativamente, la PCR permite la reproducción de las secuencias de ADN. La tecnología PCR es bien conocida en la técnica y se describe en las Patentes de EE. UU. Nos.

4,683,195, 4,800,159, 4,754,065 y 4,683,202, así como en PCR: The Polimerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkauswer Press, Boston, 1994.

El ARN puede obtenerse al utilizar el ADN aislado
5 en un vector apropiado e insertarlo en una célula huésped apropiada. Cuando las réplicas celulares y el ADN se transcriben en ARN, el ARN entonces se aísla utilizando métodos bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica como se establece en Sambrook et al., 1989, *supra*,
10 por ejemplo.

Los vectores de clonación adecuados pueden construirse de acuerdo con técnicas estándar o pueden seleccionarse a partir de un gran número de vectores de clonación disponibles en la técnica. Mientras que el vector
15 de clonación seleccionado puede variar de acuerdo con la célula huésped prevista que se va a utilizar, los vectores de clonación útiles generalmente tendrán la capacidad de autorreplicarse, pueden poseer un solo objetivo para una endonucleasa de restricción particular y/o puede portar genes
20 para un marcador que puede utilizarse en seleccionar clones que contengan el vector. Ejemplos adecuados incluyen plásmidos y virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19,

Bluescript (por ejemplo, pBS SK+) y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN de fagos y vectores lanzadera tales como as pSA3 y pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación están disponibles a partir de
5 proveedores comerciales tales como BioRad, Strategene e Invitrogen.

Además, se proporcionan los vectores de expresión. Los vectores de expresión pueden replicarse en general en constructos de polinucleótido que contienen un polinucleótido
10 de acuerdo con la invención. Esto implica que un vector de expresión pueda replicarse en las células huésped ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen, pero no se limitan a plásmidos, vectores virales incluyendo los adenovirus,
15 virus adeno-asociados, retrovirus, cósmidos y vectores de expresión descritos en la Publicación de PCT No. WO 87/04462. Los componentes del vector pueden incluir en general, pero no limitarse a uno o más de los siguientes: una secuencia de señal; un origen de la replicación; uno o más genes
20 marcadores; elementos adecuados que controlan la transcripción (tales como promotores, intensificadores y terminadores). Para la expresión (es decir, la traducción),

también son normalmente requeridos uno o más elementos que controlan la traducción, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de inicio de la traducción y codones de terminación.

5 Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula huésped por cualquiera de una cantidad de medios apropiados, incluyendo electroporación, transfección que emplea cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras
10 sustancias; bombardeo por microproyectiles; lipofección; e infección (por ejemplo, cuando el vector es un agente infeccioso tal como un virus de vacuna). La elección de introducir vectores o polinucleótidos a menudo dependerá de las características de la célula huésped.

15 La invención también proporciona células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente. Cualesquier células huésped capaces de sobreexpresar los ADN heterólogos pueden utilizarse para el propósito de aislar los genes que codifican el anticuerpo,
20 polipéptido o proteína de interés. Ejemplos no limitantes de células huésped de mamífero incluyen, pero no se limitan a células COS, HeLa y CHO. Ver también la Publicación de PCT

No. WO 87/04462. Las células huésped que no son de mamífero adecuadas incluyen procariotas (tales como *E. coli* o *B. subtilis*) y levaduras (tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; o *K. lactis*). De preferencia, las células huésped expresan los
5 ADNc a un nivel de aproximadamente 5 veces más, de mayor preferencia, 10 veces más, incluso de mayor preferencia, 20 veces más que el del anticuerpo endógeno o proteína de interés correspondiente, si está presente, en las células huésped. La selección de células huésped para una unión
10 específica a GITR o un dominio de GITR se efectúa mediante un inmunoensayo o FACS. Puede identificarse una célula que sobreexpresa el anticuerpo o proteína de interés.

Un vector de expresión puede utilizarse para dirigir la expresión de un anticuerpo anti-GITR. Aquel con
15 experiencia en la técnica está familiarizado con la administración de los vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena *in vivo*. Ver, por ejemplo, Patentes de los EE. UU. Nos. 6,436,908; 6,413,942; y 6,376,471. La administración de vectores de expresión incluye
20 la administración local o sistémica, incluyendo inyección, administración oral, cañón de partículas o administración cateterizada y la administración tópica. En otra modalidad,

el vector de expresión se administra directamente sobre el tronco simpático o ganglionar o en una arteria coronaria, atrio, ventrículo o pericardio.

También puede utilizarse la administración dirigida
5 de las composiciones terapéuticas que contienen un vector de expresión o polinucleótidos subgenómicos. Las técnicas de administración de ADN mediado por receptor se describen, por ejemplo, en Findeis et al., Trends Biotechnol., 1993, 11:202; Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods and Applications Of
10 Direct Gene Transfer, J.A. Wolff, ed., 1994; WO et al., J. Biol. Chem., 1988, 263:621; WO et al., J. Biol. Chem., 1994, 269:542; Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87:3655; WO et al., J. Biol. Chem., 1991, 266:338. Las composiciones terapéuticas que contienen un polinucléotido se
15 administran en un margen de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para su administración local en un protocolo de terapia génica. Los márgenes de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, de
20 aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg y de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN también pueden utilizarse durante un protocolo de terapia génica. Los

polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos pueden administrarse utilizando vehículos de administración génica. El vehículo de administración génica puede ser de origen viral o no viral (ver en general, Jolly, Cancer Gene Therapy, 1994, 1:51; Kimura, Human Gene Therapy, 1994, 5:845; Connelly, Human Gene Therapy, 1995, 1:185; y Kaplitt, Nature Genetics, 1994, 6:148). La expresión de tales secuencias de codificación puede inducirse utilizando promotores heterólogos o de mamífero endógenos. La expresión de la secuencia de codificación puede ser ya sea constitutiva o regulada.

Los vectores a base de virus para la administración de un polinucleótido deseado y la expresión en una célula deseada se conocen bien en la técnica. Los vehículos a base de virus ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los retrovirus recombinantes (ver, por ejemplo, Publicaciones de PCT Nos. WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; Patentes de los EE. UU. Nos. 5, 219,740 y 4,777,127; Patente GB No. 2,200,651; y Patente EP No. 0 345 242), vectores a base de alfavirus (por ejemplo, vectores del virus Sindbis, de virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), de virus del Río Ross

(ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y de virus de encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)) y de virus adeno-asociados (AAV) (ver, por ejemplo, Publicaciones de PCT Nos. WO 94/12649, WO 93/03769; WO 5 93/19191; WO 4/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655). También puede emplearse la administración de ADN enlazado para exterminar adenovirus como se describe en Curiel, Hum. Gene Ther., 1992, 3:147.

También pueden emplearse vehículos y métodos de 10 administración no viral, que incluyen, pero no se limitan a ADN condensado policationico enlazado o no enlazado sólo para exterminar adenovirus (ver, por ejemplo, Curiel, Hum. Gene Ther., 1992, 3:147); ADN enlazado al ligando (ver, por ejemplo, WO, J. Biol. Chem., 1989, 264:16985); células de 15 vehículos de administración de células eucarióticas (ver, por ejemplo, Patente de los EE. UU. No. 5,814,482; Publicaciones de PCT Nos. WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; y WO 97/42338) y neutralización de la carga de ácidos nucleicos o fusión con membranas celulares. También puede emplearse ADN 20 desnudo. Los métodos ejemplares de introducción de ADN desnudo se describen en las Publicaciones de PCT No. WO 90/11092 y Patente de los EE. UU. No. 5,580,859. Los

liposomas que pueden actuar como vehículos de administración génica se describen en la Patente de los EE. UU. No. 5,422,120; Publicaciones de PCT Nos. WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; y EP 0524968. Procedimientos
5 adicionales se describen en Philip, Mol. Cell Biol., 1994, 14:2411 y en Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci., 1994, 91:1581.

Composiciones

10 La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-GITR descrito en la presente. Ejemplos de tales composiciones, así sobre cómo formularlas también se describen en la presente. En algunas modalidades, la
15 composición comprende uno o más anticuerpos anti-GITR. En otras modalidades, el anticuerpo anti-GITR reconoce a GITR. En otras modalidades, el anticuerpo anti-GITR es un anticuerpo humano. En otras modalidades, el anticuerpo anti-GITR es un anticuerpo humanizado. En algunas modalidades, el
20 anticuerpo anti-GITR comprende una región constante, que es capaz de desencadenar una respuesta inmune deseada, tal como la lisis mediada por anticuerpo, ADCC, y/o ADCP. En otras

modalidades, el anticuerpo anti-GITR comprende una región constante que no desencadena una respuesta inmune indeseada o no deseable, tal como una lisis mediada por anticuerpo, ADCC, y/o ADCP. En otras modalidades, el anticuerpo anti-GITR
5 comprende una o más CDR del anticuerpo (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco o en algunas modalidades, las seis CDR).

Se entenderá que las composiciones pueden comprender más de un anticuerpo anti-GITR (por ejemplo, una mezcla de anticuerpos de GITR que reconocen epítopos
10 diferentes de GITR). Otras composiciones ejemplares comprenden más de un anticuerpo anti-GITR que reconoce los mismos epítopos o especies diferentes de anticuerpos anti-GITR que se unen a epítopos diferentes de GITR. En algunas modalidades, las composiciones comprenden una mezcla de
15 anticuerpos anti-GITR que reconocen variantes diferentes de GITR.

La composición utilizada en la presente invención además puede comprender portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables (Remington: The
20 Science and practice of Pharmacy 20^a edición, 2000, Lippincott Williams y Wilkins, Ed. K. E. Hoover), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Portadores,

excipientes o estabilizadores aceptables que no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones y pueden comprender soluciones amortiguadoras tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que
5 incluyen ácido ascórbico y metionina; conservadores (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol;
10 ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menor que aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina,
15 glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio;
20 complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o

polietilenglicol (PEG). Los excipientes farmacéuticamente aceptables se describen además en la presente.

También puede utilizarse el anticuerpo anti-GITR y composiciones del mismo junto con o administrarse por separado, de forma simultánea o secuencial con otros agentes que sirven para intensificar y/o complementar la efectividad de los agentes.

La invención también proporciona composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden cualquiera de los polinucleótidos de la invención. En algunas modalidades, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo como se describe en la presente. En otra modalidad, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente.

Métodos para prevenir o tratar padecimientos mediados por GITR

Los anticuerpos y conjugados de anticuerpo de la presente invención son útiles en diversas aplicaciones que

incluyen, pero no se limitan a métodos de tratamiento terapéutico y métodos de tratamiento de diagnóstico.

En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar un cáncer. En algunas modalidades, el método para
5 tratar un cáncer en un sujeto comprende administrar al sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una composición (por ejemplo, composición farmacéutica) que comprende cualquiera de los anticuerpos de GITR como se describe en la presente. Como se utiliza en la presente, los
10 cánceres incluyen pero no se limitan a cáncer relacionado con células B, cáncer gástrico, cáncer de intestino delgado, sarcoma, cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, cáncer de cabeza y cuello de células escamosas), cáncer tímico, cáncer epitelial, cáncer salival, cáncer de hígado, cáncer biliar,
15 tumores neuroendócrinos, cáncer de estómago, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer esofágico, cáncer pancreático, glioma, cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células renales), cáncer de vejiga, cáncer cervical, cáncer
20 uterino, cáncer vulvar, cáncer penil, cáncer testicular, cáncer anal, coriocarcinoma, cáncer colorrectal, cáncer oral,

cáncer de piel, carcinoma de células de Merkel, glioblastoma, tumor cerebral, cáncer de hueso, cáncer ocular y melanoma.

En algunas modalidades, el cáncer relacionado con células B es, pero no se limita a mieloma múltiple, neoplasma de células plasmáticas malignas, linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin predominante en linfocitos nodulares , enfermedad de Hahler y mielomatosis, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma, leucemia prolinfocítica de células B, leucemia de células pilosas, linfoma de no Hodgkin (NHL) de células B , leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de zona marginal, linfoma de células de manto, linfoma de células grandes, linfoma linfoblástico de células B precursoras, leucemia mieloide, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de células B grandes difusas, linfoma folicular, linfoma de zona marginal, linfoma de tejido linfático asociado con la mucosa, linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma de células de manto, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes (tímico) mediastinal primario, linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de células B de la zona marginal nodal,

linfoma esplénico de zona marginal, linfoma intravascular de células B grandes , linfoma de efusión primaria, granulomatosis linfomatoide, linfoma de células B grandes rico en células T/histiocitos, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma primario de células B grandes difusas cutáneas(tipo pierna), linfoma de células B grandes difusas positivas a EBV de los adultos mayores, linfoma de células B grandes difusas asociado con inflamación, linfoma intravascular de células B grandes , linfoma de células B grandes positivas a ALK, linfoma plasmablástico, linfoma de células B grandes que surgen en la enfermedad Castleman multicéntrica asociada a HHV8, linfoma de células B no clasificadas con características intermedias entre linfoma de células B grandes difusas y linfoma de Burkitt, linfoma de células B no clasificadas con características intermedias entre linfoma de células B grandes difusas y linfoma de Hodgkin clásico y otro linfoma relacionado de células B.

En algunas modalidades, el cáncer es reincidente o refractario.

En algunas modalidades, el cáncer es localmente avanzado o melanoma metastásico, cáncer de cabeza y cuello de células escamosas (SCHNC), cáncer de ovario, cáncer renal,

cáncer gástrico o cáncer de pulmón (por ejemplo, NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas)).

En algunas modalidades, se proporciona un método para inhibir el crecimiento o avance del tumor en un sujeto, que comprende administrar al sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una composición que comprende los anticuerpos anti-GITR como se describe en la presente. En algunas modalidades, se proporciona un método para inhibir la metástasis de células cancerígenas en un sujeto, que comprende administrar al sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una composición que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-GITR como se describe en la presente. En otras modalidades, se proporciona un método para inducir la regresión de un tumor en un sujeto, que comprende administrar al sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una composición que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-GITR como se describe en la presente.

En otro aspecto, se proporciona un método para detectar, diagnosticar y/o monitorear un cáncer. Por ejemplo, como se describe en la presente, los anticuerpos anti-GITR pueden etiquetarse con una porción detectable tal como un agente de formación de imágenes y una etiqueta para enzima-

sustrato. Como se describe en la presente, los anticuerpos también pueden utilizarse para ensayos de diagnóstico *in vivo* tales como la formación de imágenes *in vivo* (por ejemplo, PET o SPECT) o un reactivo de tinción.

5 En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente además comprenden un paso de tratar un sujeto con una forma adicional de terapia. En algunas modalidades, la forma adicional de terapia es una terapia anti-cáncer adicional que incluye, pero no se limita quimioterapia, 10 radiación, cirugía, terapia hormonal, y/o inmunoterapia adicional.

 En relación a todos los métodos descritos en la presente, al hacer referencia a anticuerpos anti-GITR también incluye composiciones que comprenden uno o más agentes 15 adicionales. Estas composiciones además pueden comprender excipientes adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables incluyendo soluciones amortiguadoras que se conocen bien en la técnica. La presente invención puede utilizarse sola o en combinación con otros 20 métodos de tratamiento.

 El anticuerpo anti-GITR puede administrarse a un sujeto mediante cualquier vía adecuada. Será aparente para

una persona con experiencia en la técnica que los ejemplos descritos en la presente no pretenden limitarse sino ser ilustrativos de las técnicas disponibles. En consecuencia, en algunas modalidades, el anticuerpo anti-GITR se administra a
5 un sujeto de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o mediante la infusión continua durante un período de tiempo, mediante las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, transdérmica, subcutánea, intra-
10 articular, sublingual, intrasinovial, mediante insuflación, intratecal, oral, inhalación o tópica. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, administración intravenosa o localizada. Los nebulizadores comercialmente disponibles para las formulaciones líquidas incluyen los nebulizadores
15 por aspersión y los nebulizadores ultrasónicos que son útiles para su administración. Las formulaciones líquidas pueden nebulizarse directamente y el polvo liofilizado puede nebulizarse después de su reconstitución. Alternativamente, el anticuerpo anti-GITR puede atomizarse utilizando una
20 formulación de fluorocarbonos y un inhalador de dosis medidas o inhalarse como un polvo liofilizado y pulverizado.

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-GITR se administra mediante técnicas de administración específicas del sitio o locales dirigidas. Ejemplos de técnicas de administración específicas del sitio o locales dirigidas
5 incluyen diversas fuentes de depósito implantable del anticuerpo anti-GITR o catéteres de administración local, tales como catéteres de infusión, catéteres permanentes o catéteres con aguja, injertos sintéticos, envolturas adventicias, derivaciones y stents u otros dispositivos
10 implantables, portadores específicos del sitio, inyección directa o aplicación directa. Ver, por ejemplo, Publicaciones de PCT No. WO 00/53211 y Patente de los EE. UU. No. 5,981,568.

Pueden utilizarse diversas formulaciones de un
15 anticuerpo anti-GITR para su administración. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-GITR puede administrarse puro. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-GITR y un excipiente farmacéuticamente aceptable pueden estar en diversas formulaciones. Los excipientes farmacéuticamente
20 aceptables se conocen en la técnica y son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente efectiva. Por ejemplo, un

excipiente puede dar forma o consistencia o actuar como un diluyente. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a agentes estabilizantes, de humectación y agentes emulsionantes, sales para hacer variar la osmolaridad, 5 agentes encapsulantes, soluciones amortiguadoras e intensificadores de penetración en la piel. Los excipientes, así como las formulaciones para la administración parenteral y no parenteral del fármaco se establecen en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 10 2000.

En algunas modalidades, estos agentes se formulan para su administración por inyección (por ejemplo, vía intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). En consecuencia, estos agentes pueden combinarse con 15 vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y similares. El régimen de dosificación particular, es decir, la dosis, sincronización y repetición, dependerán del individuo particular y del historial médico del individuo.

20 Un anticuerpo anti-GITR puede administrarse utilizando cualquier método adecuado, incluyendo por inyección (por ejemplo, vía intraperitoneal, intravenosa,

subcutánea, intramuscular, etc.). Como se describe en la presente los anticuerpos anti-GITR también pueden administrarse vía tópica o mediante inhalación, En general, para la administración de los anticuerpos anti-GITR, la dosificación candidato puede administrarse diariamente, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada cinco semanas, cada seis semanas, cada siete semanas, cada ocho semanas, cada diez semanas, cada doce semanas o más de cada doce semanas. Para las dosis repetidas durante varios días o más prolongado, dependiendo del padecimiento, el tratamiento se sostiene hasta que ocurre una supresión deseada de los síntomas o hasta que se logran los niveles terapéuticos suficientes, por ejemplo, para reducir los síntomas asociados con cáncer. El avance de esta terapia se monitorea fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales. El régimen de dosificación (incluyendo el anticuerpo anti-GITR utilizado) puede variar con el tiempo.

En algunas modalidades, la dosificación candidato se administra diariamente con la dosificación que oscila de aproximadamente cualquiera de 1 $\mu\text{g/kg}$ a 30 $\mu\text{g/kg}$, a 300 $\mu\text{g/kg}$ a 3 mg/kg , a 30 mg/kg , a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, puede

utilizarse la dosificación diaria de aproximadamente 0.01 mg/kg, aproximadamente 0.03 mg/kg, aproximadamente 0.1 mg/kg, aproximadamente 0.3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2.5 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg y aproximadamente 25 mg/kg.

En algunas modalidades, la dosificación candidato se administra cada semana con la dosificación que oscila de aproximadamente cualquiera de 1 µg/kg a 30 µg/kg, a 300 µg/kg a 3 mg/kg, a 30 mg/kg, a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, puede utilizarse una dosificación a la semana de aproximadamente 0.01 mg/kg, aproximadamente 0.03 mg/kg, aproximadamente 0.1 mg/kg, aproximadamente 0.3 mg/kg, aproximadamente 0.5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2.5 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg.

En algunas modalidades, la dosificación candidato se administra cada dos semanas con la dosificación que oscila de aproximadamente cualquiera de 1 µg/kg a 30 µg/kg, a 300 µg/kg, a 3 mg/kg, a 30 mg/kg, a 100 mg/kg o más, dependiendo

de los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, puede utilizarse una dosificación cada dos semanas de aproximadamente 0.1 mg/kg, aproximadamente 0.3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2.5 mg/kg, 5 aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg.

En algunas modalidades, la dosificación candidato se administra cada tres semanas con la dosificación que 10 oscila de aproximadamente cualquiera de 1 µg/kg a 30 µg/kg, a 300 µg/kg, a 3 mg/kg, a 30 mg/kg, a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, puede utilizarse una dosificación cada tres semanas de aproximadamente 0.1 mg/kg, aproximadamente 0.3 mg/kg, 15 aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2.5 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, 20 aproximadamente 45 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg.

En algunas modalidades, la dosificación candidato se administra cada mes o cada cuatro semanas con la

dosificación que oscila de aproximadamente cualquiera de 1 µg/kg a 30 µg/kg, a 300 µg/kg, a 3 mg/kg, a 30 mg/kg, a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, puede utilizarse una dosificación

5 mensual de aproximadamente 0.1 mg/kg, aproximadamente 0.3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2.5 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg,

10 aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg.

En otras modalidades, la dosificación candidato se administra diariamente con la dosificación que oscila de aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 1200 mg o más,

15 dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, puede utilizarse una dosificación diaria de aproximadamente 0.01 mg, aproximadamente 0.1 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg,

20 aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg,

aproximadamente 900 mg, aproximadamente 1000 mg,
aproximadamente 1100 mg o aproximadamente 1200 mg.

En otras modalidades, la dosificación candidato se
administra cada semana con la dosificación que oscila de
5 aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 2000 mg o más,
dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Por
ejemplo, puede utilizarse una dosificación semanal de
aproximadamente 0.01 mg, aproximadamente 0.1 mg,
aproximadamente 1 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente
10 50 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg,
aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg,
aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg,
aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg,
aproximadamente 900 mg, aproximadamente 1000 mg,
15 aproximadamente 1100 mg, aproximadamente 1200 mg,
aproximadamente 1300 mg, aproximadamente 1400 mg,
aproximadamente 1500 mg, aproximadamente 1600 mg,
aproximadamente 1700 mg, aproximadamente 1800 mg,
aproximadamente 1900 mg o aproximadamente 2000 mg.

20 En otras modalidades, la dosificación candidato se
administra cada dos semanas con la dosificación que oscila de
aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 2000 mg o más,

dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, puede utilizarse una dosificación cada dos semanas de aproximadamente 0.01 mg, aproximadamente 0.1 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente

5 50 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 1000 mg,

10 aproximadamente 1100 mg, aproximadamente 1200 mg, aproximadamente 1300 mg, aproximadamente 1400 mg, aproximadamente 1500 mg, aproximadamente 1600 mg, aproximadamente 1700 mg, aproximadamente 1800 mg, aproximadamente 1900 mg o aproximadamente 2000 mg.

15 En otras modalidades, la dosificación candidato se administra cada tres semanas con la dosificación que oscila de aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 2500 mg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, puede utilizarse una dosificación cada tres semanas

20 de aproximadamente 0.01 mg, aproximadamente 0.1 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg,

aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg,
aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg,
aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg,
aproximadamente 900 mg, aproximadamente 1000 mg,
5 aproximadamente 1100 mg, aproximadamente 1200 mg,
aproximadamente 1300 mg, aproximadamente 1400 mg,
aproximadamente 1500 mg, aproximadamente 1600 mg,
aproximadamente 1700 mg, aproximadamente 1800 mg,
aproximadamente 1900 mg, aproximadamente 2000 mg,
10 aproximadamente 2100 mg, aproximadamente 2200 mg,
aproximadamente 2300 mg, aproximadamente 2400 mg o
aproximadamente 2500 mg.

En otras modalidades, la dosificación candidato se
administra cada cuatro semanas o al mes con la dosificación
15 que oscila de aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 3000
mg o más, dependiendo de los factores mencionados
anteriormente. Por ejemplo, puede utilizarse una dosificación
mensual de aproximadamente 0.01 mg, aproximadamente 0.1 mg,
aproximadamente 1 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente
20 50 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg,
aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg,
aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg,

aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg,
 aproximadamente 900 mg, aproximadamente 1000 mg,
 aproximadamente 1100 mg, aproximadamente 1200 mg,
 aproximadamente 1300 mg, aproximadamente 1400 mg,
 5 aproximadamente 1500 mg, aproximadamente 1600 mg,
 aproximadamente 1700 mg, aproximadamente 1800 mg,
 aproximadamente 1900 mg, aproximadamente 2000 mg,
 aproximadamente 2100 mg, aproximadamente 2200 mg,
 aproximadamente 2300 mg, aproximadamente 2400 mg,
 10 aproximadamente 2500, aproximadamente 2600 mg,
 aproximadamente 2700 mg, aproximadamente 2800 mg,
 aproximadamente 2900 mg o aproximadamente 3000 mg.

Para el propósito de la presente invención, la
 dosificación apropiada de un anticuerpo anti-GITR dependerá
 15 del anticuerpo anti-GITR empleado (o composiciones del
 mismo), el tipo y gravedad de los síntomas que se van a
 tratar, si el agente se administra para propósitos
 preventivos o terapéuticos, terapia previa, el historial
 clínico del paciente y respuesta del agente, la tasa de
 20 eliminación del paciente para el agente administrado y la
 discreción del médico tratante. Normalmente, el clínico
 administrará un anticuerpo anti-GITR hasta que se alcance una

dosificación que logre el resultado deseado. La dosis y/o frecuencia puede variar con el curso del tratamiento. Consideraciones empíricas tales como la vida media, contribuirán en general a la determinación de la dosificación. Por ejemplo, los anticuerpos que son compatibles con el Sistema inmune humano, tales como los anticuerpos humanizados o anticuerpos totalmente humanos, pueden utilizarse para prolongar la vida media del anticuerpo y evitar que el anticuerpo sea atacado por el sistema inmune del huésped. La frecuencia de administración puede determinarse y ajustarse con el curso de la terapia y en general, pero no necesariamente, se basa en el tratamiento y/o supresión y/o mejora y/o retraso de los síntomas. Alternativamente, pueden ser apropiadas las formulaciones de anticuerpos anti-GITR de liberación sostenida continua. Se conocen en la técnica diversas formulaciones y dispositivos para lograr la liberación sostenida.

En una modalidad, las dosificaciones para un anticuerpo pueden determinarse de forma empírica en los individuos a quienes se les ha dado una o más administraciones de un anticuerpo. Por ejemplo, a los individuos se les dan dosificaciones incrementadas de un

anticuerpo anti-GITR. Para evaluar la eficacia, puede seguirse un indicador de la enfermedad.

Como se describe en la presente, la administración de un anticuerpo anti-GITR de acuerdo con el método de la presente invención puede ser continua o intermitente, 5 dependiendo, por ejemplo, del padecimiento fisiológico del receptor, si el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico y otros factores conocidos por los profesionales experimentados. La administración un anticuerpo 10 anti-GITR puede ser esencialmente continua durante un período preseleccionado de tiempo o puede ser en una serie de dosis separadas.

En algunas modalidades, puede estar presente más de un anticuerpo anti-GITR. Al menos uno, al menos dos, al menos 15 tres, al menos cuatro, al menos cinco anticuerpos diferentes o más pueden estar presentes. En general, aquellos anticuerpos anti-GITR pueden tener actividades complementarias que no se afecten de modo adverso entre sí.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-GITR 20 puede administrarse en combinación con la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales. Estos incluyen, pero no se limitan a la administración de un agente

bioterapéutico, un agente quimioterapéutico, una vacuna, una
terapia a base de células CAR-T, radioterapia, una terapia de
citocinas (por ejemplo, IL-2, IL-7, IL-15, IL-12, IFN γ , IFN α ,
IL-8), una vacuna, un inhibidor de otras rutas
5 inmunosupresoras, un inhibidor de la angiogénesis, un
activador de células T, un inhibidor de una ruta metabólica,
un inhibidor de mTOR (del objetivo mecánico de rapamicina)
(por ejemplo, rapamicina, derivados de rapamicina, sirolimus,
temsirolimus, everolimus y deforolimus), un inhibidor de una
10 ruta de adenosina, un inhibidor de tirosina cinasa incluido
pero no limitado a inhibidores de inlyta, ALK (linfoma cinasa
anaplásica) (por ejemplo, crizotinib, ceritinib, alectinib y
sunitinib), un inhibidor BRAF (por ejemplo, vemurafenib y
dabrafenib), un modificador epigenético, un inhibidor o
15 supresor de células Treg y/o de células supresoras derivadas
mieloides, un inhibidor JAK (Janus cinasa) (por ejemplo,
ruxolitinib y tofacitinb, varicitinib, filgotinib,
gandotinib, lestaurtinib, momelotinib, pacritinib y
upadacitinib), un inhibidor STAT (transductores de señal y
20 activadores de la transcripción) (por ejemplo, inhibidores
STAT1, STAT3 y STAT5 tales como fludarabina), un inhibidor de
cinasa dependiente de ciclina, un agente inmunogénico (por

ejemplo, células cancerosas atenuadas, antígenos de tumor, células que presentan antígeno tales como células dendríticas pulsadas con antígeno derivado de tumor o ácidos nucleicos, citocinas estimuladoras inmunes (por ejemplo, IL-2, IFN α 2, GM-CSF), un inhibidor MEK (por ejemplo, trametinib, cobimetinib, binimetinib y selumetinib), un inhibidor GLS1, un inhibidor PAP, un virus oncolítico, un inhibidor IDO (2,3-dioxigenasa de indoleamina-pirrol) y células transfectadas con genes que codifican las citocinas estimulantes inmunes tales como, pero no limitadas a GM-CSF).

En algunas modalidades, el agente bioterapéutico es un anticuerpo que incluye pero no se limita a un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-4-1BB, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-TIM3, un anticuerpo anti-LAG3, un anticuerpo anti-TIGIT, un anticuerpo anti-OX40, un anticuerpo de IL-8, un anticuerpo anti-HVEM, un anticuerpo anti-BTLA, un anticuerpo anti-CD40, un anticuerpo anti-CD40L, anticuerpo anti-CD47, un anticuerpo anti-CSF1R, un anticuerpo anti-CSF1, un anticuerpo anti-MARCO, anticuerpos anti-CXCR4, un anticuerpo anti-VEGFR1, un anticuerpo anti-VEGFR2, un anticuerpo anti-TNFR1, un anticuerpo anti-TNFR2, un anticuerpo biespecífico anti-CD3,

un anticuerpo anti-CD19, un anti-CD20, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-ICOS, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD52, un anticuerpo anti-CCR4, un anticuerpo anti-CCR8, un anticuerpo anti-CD200R, un anticuerpo anti-VISG4, un anticuerpo anti-CCR2, un anticuerpo anti-LILRb2, un anticuerpo anti-CXCR4, un anticuerpo anti-CD206, un anticuerpo anti-CD163, un anticuerpo anti-KLRG1, un anticuerpo anti-FLT3, un anticuerpo anti-B7-H4, un anticuerpo anti-B7-H3 o un segundo anticuerpo anti-GITR.

En consecuencia, en algunas modalidades, se utiliza un anticuerpo anti-GITR junto con, por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-PD-L1, tal como BMS-936559 (MDX-1105), MPDL3280A y avelumab (MSB0010718C); un anticuerpo antagonista anti-PD-1 tal como por ejemplo, nivolumab (OPDIVO®), pembrolizumab (KEYTRUDA®) y pidilizumab; un anticuerpo antagonista anti-CTLA-4 tal como por ejemplo, ipilimumab (YERVOY®); un anticuerpo antagonista anti-LAG-3 tal como BMS-986016 y IMP701; un anticuerpo antagonista anti-TIM-3; un anticuerpo antagonista anti-B7-H3 tal como por ejemplo, MGA271; un anticuerpo antagonista anti-VISTA; un anticuerpo antagonista anti-TIGIT; un anticuerpo antagonista anti-CD28;

un anticuerpo antagonista anti-CD80; un anticuerpo antagonista anti-CD86; un anticuerpo antagonista anti-B7-H4; un anticuerpo antagonista anti-ICOS; un anticuerpo antagonista anti-CD28; un modulador innato de la respuesta inmune (por ejemplo, los TLR, KIR, NKG2A) y un inhibidor IDO. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-GITR se utiliza junto con un agonista 4-1BB (CD137) tal como, por ejemplo, PF-05082566 o urelumab (BMS-663513). En algunas modalidades, un anticuerpo anti-GITR se utiliza junto con un agonista OX40 tal como, por ejemplo, un anticuerpo agonista anti-OX-40. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-GITR se utiliza junto con otro agonista de GITR tal como, por ejemplo, TRX518. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-GITR se utiliza junto con un inhibidor IDO. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-GITR se utiliza junto con una terapia de citocinas tal como, por ejemplo, sin limitación, IL-2, IL-12, IL-7, IL-15, IL-21, IL-33, CSF-1, MCSF-1, etc.

Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida; alquilsulfonates tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que

incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el topotecán
5 análogo sintético); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos de adozelesina, carzelesina y análogos sintéticos de bizelesina); criptoficinas (en particular criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y
10 CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato del óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina,
15 prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de Enedina (por ejemplo caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma 1 y caliqueamicina phi11,
20 ver, por ejemplo, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bifosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo

de neocarzinostatina y cromóforos de antibiótico relacionados con la cromoproteína eneidina), aclacinomisinas, actinomicina, authramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), doxorubicina liposomal pegilada, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostanol,

testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida,
 mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tales
 como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida;
 ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo;
 5 bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona;
 elformitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido;
 nitrato de galio; hidroxurea; lentinán; lonidamina;
 maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas;
 mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina;
 10 pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido
 podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; razoxano;
 rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico;
 triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; tricotecenos
 (especialmente la toxina T-2, verracurina A, roridina A y
 15 anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina;
 mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido
 ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa ; taxoides, por ejemplo
 paclitaxel y doxetaxel; clorambucilo; gemcitabina; 6-
 tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino
 20 tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino;
 etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina;
 vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina;

aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera
5 de los anteriores. También se incluyen agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal de los tumores tales como anti-estrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, droloxifeno,
10 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos de las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetinida, acetato de
15 megestrol, exemestano, formestano, fadrozol, vorozol, letrozol y anastrozol; y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprólido y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

20 En algunas modalidades, un anticuerpo anti-GITR se utiliza junto con uno o más de otros agentes terapéuticos que dirigen un modulador de punto de control inmune, tal como,

por ejemplo sin limitación, un agente que dirige PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3, B7-H3, B7-H4, B7-DC (PD-L2), B7-H5, B7-H6, B7-H8, B7-H2, B7-1, B7-2, ICOS, ICOS-L, TIGIT, CD2, CD47, CD80, CD86, CD48, CD58, CD226, CD155, CD112, LAIR1, 2B4, BTLA, CD160, TIM1, TIM-3, TIM4, VISTA (PD-H1), OX40, OX40L, GITRL ,
 5 CD70, CD27 , 4-1BB, 4-BBL, DR3, TL1A, CD40, CD40L, CD30, CD30L, LIGHT, HVEM, SLAM (SLAMF1, CD150), SLAMF2 (CD48), SLAMF3 (CD229), SLAMF4 (2B4, CD244), SLAMF5 (CD84), SLAMF6 (NTB-A), SLAMCF7 (CS1), SLAMF8 (BLAME), SLAMF9 (CD2F), CD28,
 10 CEACAM1(CD66a), CEACAM3, CEACAM4, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7, CEACAM8, CEACAM1-3AS CEACAM3C2, CEACAM1-15, PSG1-11, CEACAM1-4C1, CEACAM1-4S, CEACAM1-4L, IDO, TDO, CCR2, ruta de CD39-CD73-adenosina (A2AR), los BTK, los TIK, CXCR2, CCR4, CCR8, CCR5, la ruta de VEGF, CSF-1 o un modulador innato de la
 15 respuesta inmune.

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-GITR se utiliza junto con un agente bioterapéutico y un agente quimioterapéutico. Por ejemplo, se proporciona un método para tratar cáncer en un sujeto en necesidad del mismo que
 20 comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva del anticuerpo anti-GITR como se describe en donde, un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 (por ejemplo, avelumab) y un agente

quimioterapéutico (por ejemplo, gemcitabina, metotrexato o un análogo de platino). En algunas modalidades, se proporciona un método para tratar cáncer en un sujeto en necesidad del mismo que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva del anticuerpo anti-GITR como se describe en donde, un anticuerpo antagonista anti-PD-1 (por ejemplo, nivolumab (OPDIVO®) o pembrolizumab (KEYTRUDA®) y un agente quimioterapéutico (por ejemplo, gemcitabina, metotrexato o un análogo de platino). En algunas modalidades, se proporciona un método para tratar cáncer en un sujeto en necesidad del mismo que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva del anticuerpo anti-GITR como se describe en donde, un anticuerpo antagonista anti-CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab (YERVOY®)) y un agente quimioterapéutico (por ejemplo, gemcitabina, metotrexato o un análogo de platino).

En algunas modalidades, la terapia con el anticuerpo anti-GITR puede preceder o seguir al otro agente de tratamiento por intervalos que oscilan de minutos a semanas. En modalidades donde se administran por separado los otros agentes y/o proteínas o polinucleótidos, uno podría asegurar en general que un período significativo de tiempo no caduque entre cada administración, de modo que el agente y la

composición de la presente invención podría ser capaz de ejercer un efecto combinado de modo ventajoso en el sujeto. En tales casos, se contempla que uno puede administrar ambas modalidades durante aproximadamente 12-24 h una de la otra, 5 de mayor preferencia, durante aproximadamente 6-12 h una de la otra. En algunas situaciones, puede desearse extender significativamente el período de tiempo para la administración, sin embargo, cuando es un lapso de varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 7 u 8) entre las administraciones respectivas.

En algunas modalidades, una composición de anticuerpo anti-GITR comprende un segundo agente seleccionado de crizotinib, palbociclib, gemcitabina, ciclofosfamida, fluorouracilo, FOLFOX, ácido folínico, oxaliplatino, 15 axitinib, malato de sunitinib, tofacitinib, bevacizumab, rituximab y trastuzumab.

En algunas modalidades, una composición de anticuerpo anti-GITR se combina con un régimen de tratamiento que además comprende una terapia tradicional seleccionada del 20 grupo que consiste de: cirugía, terapia de radiación, quimioterapia, terapia dirigida, inmunoterapia, terapia hormonal, inhibición de la angiogénesis y cuidado paliativo.

Formulaciones

Las formulaciones terapéuticas del anticuerpo anti-GITR utilizado de acuerdo con la presente invención se preparan para su almacenamiento al mezclar un anticuerpo que
5 tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables, (Remington, The Science y Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o
10 estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y pueden comprender soluciones amortiguadoras tales como fosfato , citrato y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro de sodio; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y
15 metionina; conservadores (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-
20 pentanol; y m-cresol); polipéptidos con bajo peso molecular (menor que aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas;

polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; 5 agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol 10 (PEG).

Los liposomas que contienen el anticuerpo anti-GITR se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 15 77:4030 (1980); y las Patentes de los EE. UU. Nos. 4,485,045 y 4,544,545. Los liposomas con un tiempo de circulación intensificada se describen en la Patente de los EE. UU. No. 5,013,556. Los liposomas particularmente útiles pueden generarse mediante el método de evaporación de fase inversa 20 con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y PEG derivado de fosfatidiletanolamina (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros o un tamaño de

poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante la polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración del fármaco coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20a edición. Mack Publishing (2000).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de los EE. UU. No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7-etil-L-

glutamato, acetato de viniletileno no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT TM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólido), isobutirato del acetato de sacarosa y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones que se van a utilizar para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante, por ejemplo, filtración a través de las membranas de filtración estériles. Las composiciones terapéuticas de anticuerpos anti-GITR se colocan en general en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o frasco de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden estar en formas de dosificación unitaria tales como tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones o supositorios, para su administración oral, parenteral o rectal o administración mediante inhalación o insuflación.

Para preparar composiciones sólidas tales como tabletas, el ingrediente activo principal se mezcla con un

portador farmacéutico, por ejemplo, ingredientes de tableteado convencional tales como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato dicálcico o gomas y otros diluyentes farmacéuticos, por ejemplo agua, para formar una composición de formulación previa sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención o una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable de la misma. Cuando se hace referencia a estas composiciones de formulación previa como homogéneas, significa que el ingrediente activo se dispersa de modo uniforme a través de toda la composición a modo que la composición pueda subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitaria igualmente efectivas, tales como tabletas, píldoras y cápsulas. La Composición de formulación previa entonces se subdivide en formas de dosificación unitaria del tipo descrito anteriormente que contiene de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo de la presente invención. Las tabletas o píldoras de la composición novedosa pueden recubrirse o de otro modo componerse para proporcionar una forma de dosificación que permita la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, la tableta o píldora puede comprender un

componente de dosificación interno y uno de dosificación externo, la última estando en forma de una envoltura sobre la anterior. Los dos componentes pueden separarse mediante una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o se retrase en su liberación. Pueden utilizarse una variedad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, tales materiales incluyen una cantidad de ácidos poliméricos y mezclas de los ácidos poliméricos con tales materiales como shellac, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Los agentes de superficie activa adecuados incluyen, en particular, agentes no iónicos, tales como polioxietilensorbitanes (por ejemplo, TweenTM 20, 40, 60, 80 u 85) y otros sorbitanes (por ejemplo, SpanTM 20, 40, 60, 80 u 85). Las composiciones con un agente de superficie activa comprenderán de modo conveniente entre 0.05 y 5% del agente de superficie activa y pueden estar entre 0.1 y 2.5%. Si es necesario, se apreciará que pueden agregarse otros ingredientes, por ejemplo, manitol u otros vehículos farmacéuticamente aceptables.

Las emulsiones adecuadas pueden prepararse utilizando emulsiones grasas comercialmente disponibles, tales como Intralipid^M, LiposynTM, InfonutrolTM, LipofundinTM y LipiphytanTM. El ingrediente activo puede ya sea disolverse en una composición de emulsión mezclada previamente o puede disolverse alternativamente en un aceite (por ejemplo, aceite de soya, aceite de cártamo, aceite de algodón, aceite de ajonjolí, aceite de maíz o aceite de almendras) y una emulsión formada después de mezclar con un fosfolípido (por ejemplo, fosfolípidos de huevo, fosfolípidos de soya o lecitina de soya) y agua. Se apreciará que pueden agregarse otros ingredientes, por ejemplo, glicerol o glucosa, para ajustar la tonicidad de la emulsión. Las emulsiones adecuadas normalmente contendrán hasta 20% de aceite, por ejemplo, entre 5 y 20%. La emulsión grasa puede contener gotitas de grasa entre 0.1 y 1.0 μm , en particular 0.1 y 0.5 μm y tienen un pH en el margen de 5.5 a 8.0.

Las composiciones emulsionantes pueden ser aquellas preparadas al mezclar un anticuerpo anti-GITR con IntralipidTM o los componentes del mismo (aceite de soya, fosfolípidos de huevo, glicerol y agua).

Las composiciones para la inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en solventes y polvos orgánicos o acuosos farmacéuticamente aceptables o mezclas de los mismos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden
5 contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se establece anteriormente. En algunas modalidades, las composiciones se administran por la vía respiratoria oral o nasal para un efecto local o sistémico. Las composiciones en solventes farmacéuticamente aceptables preferiblemente
10 estériles pueden nebulizarse mediante el uso de gases. Las soluciones nebulizadas pueden inhalarse directamente del dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización puede unirse a una mascarilla, tienda o máquina de presión positiva con presión intermitente. Las composiciones en
15 solución, suspensión o polvo pueden administrarse de preferencia vía oral o nasal a partir de dispositivos que administren la formulación de una manera apropiada.

Kits

20 La invención también proporciona kits que comprenden cualquiera o todos los anticuerpos descritos en la presente. Los kits de la invención incluyen uno o más

recipientes que comprenden un anticuerpo anti-GITR descrito en la presente e instrucciones de uso de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención descrita en la presente. En general, estas instrucciones comprenden una
5 descripción de la administración del anticuerpo anti-GITR para los tratamientos terapéuticos descritos anteriormente. En algunas modalidades, los kits se proporcionan para producir una unidad de administración de dosis unitaria. En ciertas modalidades, el kit puede contener tanto un primer
10 recipiente que tenga una proteína seca como un segundo recipiente que tenga una formulación acuosa. En ciertas modalidades, se incluyen kits que contienen jeringas unitarias llenadas previamente y de múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas y liojeringas con líquido).

15 En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Las instrucciones relacionadas con el uso de un anticuerpo anti-GITR incluyen
20 en general información como la dosificación, esquema de dosificación y vía de administración para el tratamiento previsto. Los recipientes pueden tener dosis unitarias,

paquetes por volumen (por ejemplo, paquetes de múltiples dosis) o dosis sub-unitarias. Las instrucciones suministradas en los kits de la invención normalmente son instrucciones escritas en una etiqueta o inserto de paquete (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero también son aceptables instrucciones legibles a máquina (por ejemplo, instrucciones llevadas a cabo en un disco de almacenamiento magnético u óptico).

Los kits de esta invención tienen un embalaje adecuado. El embalaje adecuado incluye, pero no se limita a, viales, botellas, frascos, embalaje flexible (por ejemplo, bolsas de Mylar o plástico selladas) y similares. También se contemplan paquetes para su uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). El recipiente también puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón

perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo anti-GITR. El recipiente además puede comprender un Segundo agente farmacéuticamente activo.

5 Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tales como soluciones amortiguadoras e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o insertos de paquete en o asociados con el recipiente.

10

Depósito biológico

Los materiales representativos de la presente invención se depositaron en la Colección Americana de Tipos de Cultivo, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-
15 2209, EE. UU., el 10 de noviembre de 2016. El vector h3G7R5-VH que tiene el No. de acceso ATCC PTA-123632 es un polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada h3G7R5 y el vector que tiene el No. de acceso ATCC PTA-123633 es un polinucleótido que codifica la región
20 variable de cadena ligera h3G7R5. Los depósitos se hirvieron bajo las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos

para el propósito del Procedimiento de la Patente y Regulaciones de la misma (Tratado de Budapest). Esto garantiza el mantenimiento de un cultivo viable en el depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. El
5 depósito estará disponible por ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest y sujeto a un acuerdo entre Pfizer, Inc. y ATCC, lo cual garantiza una disponibilidad permanente y no restringida al público de la progenie del cultivo en el depósito después de la emisión de la Patente de los EE. UU.,
10 pertinente o al exponerse al público de cualquier solicitud de patente extranjera o de EE. UU., lo que suceda primero y garantice la disponibilidad de la progenie a uno determinado por el Comisionado de Patentes y Marcas Comerciales de los EE. UU., para tener derecho según 35 U.S.C. § 122 y las
15 reglas del Comisionado en virtud del mismo (incluyendo 37 C.F.R. § 1.14 con referencia particular a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que, si un cultivo de los materiales en depósito pudiera morir o perderse o destruirse cuando se cultive bajo las
20 condiciones adecuadas, los materiales se reemplazarán de inmediato a la notificación con otro del mismo. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse

como una licencia para practicar la invención en contravención de los derechos otorgados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

Los siguientes ejemplos se ofrecen solo para
5 propósitos ilustrativos y no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la presente invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas en la presente se volverán aparentes para aquellos con experiencia en la técnica a partir de la
10 descripción anterior y caen dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Expresión de GITR en células T de sangre 15 **periférica humana.**

Este ejemplo ilustra la expresión de GITR por una fracción menor de subconjuntos de células T de sangre periférica en humanos.

Se evaluó la expresión de GITR en células T de
20 sangre periférica de donadores sanos. Las células T reguladoras (Tregs) CD4⁺ Foxp3⁺ contuvieron una fracción significativamente mayor de células que expresan GITR (14.35

+/-1.9%) comparadas con las células T convencionales (Tconv) CD4+ Foxp3 (4.75 +/-1.3% de células positivas GITR) o células T CD8+ (1.68 +/- 0.4% células positivas GITR) (Figura 1A). La densidad del anticuerpo anti-GITR de unión a las células
 5 positivas a GITR fue significativamente menor en las células Tconv CD4+ comparadas con las células Treg o CD8+ (Figura 1B). Las células Treg son una fracción menor que comprende 1.723 +/- 0.61%, mientras que Tconv CD4+ comprenden 33.88 +/- 3% y las células T CD8+, 20.95 +/- 5.4% de células
 10 mononucleares de sangre periférica (Figura 1C).

Ejemplo 2: Expresión de GITR y OX40 en infiltrado de células inmunes de carcinoma de células renales en humanos

Este ejemplo ilustra los niveles de expresión de
 15 GITR y OX40 en las Treg asociadas al carcinoma de células renales (RCC).

Se evaluó la expresión de GITR y OX40 en células T que infiltran el carcinoma de células renales. Las Treg CD4+ Foxp3+ Helios+ que infiltran RCC contuvieron más células que
 20 expresaban GITR y OX40 que las células T CD8+ y más células Treg y Tconv que expresaron OX40 que las células T CD8+ (Figura 2A). De las Treg, 67.8 +/- 12.2% expresaron GITR y

76.5+/- 6.5% expresaron OX40. Mientras que de las Tconv CD4+ asociadas con, 22.8+/-7.5% expresaron GITR y 32.97+/- 3.9% expresaron OX40 y células T CD8+, 12.3+/- 5% expresaron GITR y 9.7+/- 3.4% expresaron OX40 (Figura 2A). También se evaluó la densidad de unión a los anticuerpos GITR y OX40 en las células T asociadas a RCC. La densidad de unión a los anticuerpos GITR y OX40 fue significativamente mayor en las Treg que en las células Treg o células Tconv CD4+ (Figura 2B). De este modo, OX40 y GITR se expresaron de forma similar por las células T asociadas al tumor y fueron diferencialmente superiores a las Treg comparadas con las células T CD8+ y las células Teff CD4+.

Las células Treg fueron una fracción menor de las células inmunes CD45+ que infiltraron el tejido del carcinoma de células renales, comprendiendo 3.29 +/- 0.82%, mientras que las Tconv CD4+ comprendieron 15.3 +/- 3% y las células T CD8+, 41.29 +/- 5.6% (Figura 2C).

Métodos

Enriquecimiento de PBMC a partir de sangre total concentrada

Los linfocitos humanos primarios se aislaron a partir de sangre total concentrada proporcionada por el Banco

de Sangre de Stanford al diluir primero la sangre 1:4 en Solución Salina Amortiguada con Fosfato (PBS, sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}). Se aislaron Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) utilizando una capa base de degradado Ficoll (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA). La
5 capa leucocitaria cosechada se lavó dos veces con PBS y se contó. Las células se suspendieron de nuevo a $50 \times 10^6 \text{ c/mL}$ en PBS+Suero Fetal de Bovino (FBS) al 2% y se procesaron con el kit de enriquecimiento negativo de CD3 (Stem Cell Tech
10 Vancouver, BC) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Aislamiento y análisis de los linfocitos asociados al tumor:

Digestión de las muestras de tumor humanas

15 El tejido de tumor principal se recibió completo y se procesó internamente. El tejido se cortó en partes pequeñas con un escalpelo u hoja de rasurar a $\leq 0.5 \text{ cm}^3$. La disociación enzimática se realizó utilizando un Kit de Disociación de Tumor Humano (Miltenyi Biotec, San Diego, CA).
20 La monosuspensión del tumor se aseguró al hacer pasar la suspensión celular sobre un filtro de $70 \mu\text{m}$. Se corrió la lisis de RBC (si fue apropiada) utilizando la solución

amortiguadora de lisis ACK (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) durante 5 minutos a T.A. Las muestras procesadas del tumor se congelaron y se reservaron para un análisis de sangre futuro a -80°C en suero humano al 90% + DMSO al 10%.

5 Para su análisis, las células de tumor disociadas congeladas se descongelaron en RPMI suplementado con HI FBS al 10% y se dejaron reposar durante la noche antes del análisis FACS. Las células se lavaron del medio y suspendieron de nuevo en solución amortiguadora FACS.

10

Tinción del anticuerpo y análisis de citometría de flujo

Se utilizó un panel de control a modo que el fondo del anticuerpo pudiera corregirse con una Florescencia Menos Uno (FMO) la cual no incluyó anticuerpos intracelulares o
15 anticuerpos Alexa 647 (A647). Las células se tiñeron con un anticuerpo m3G7 conjugado a A647 a $1\mu\text{g/ml}$ junto con anticuerpos específicos para los receptores de superficie humana CD45, CD3, CD4, CD8 todos de BD (BD Biosciences, San Josa, CA) se diluyeron 1:50 en solución amortiguadora FACS y
20 una Tinción Celular Violeta Fijable LIVE/DEAD (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Se utilizó el kit permanente de fijación Foxp3 (eBioscience, San Diego, CA.) para teñir las

células con los marcadores intracelulares Helios (22F6, Biolegend) y Foxp3 (259D, Biolegend) según instrucciones del fabricante.

5 Análisis y segmentación para el análisis por
citometría de flujo.

Las muestras se analizaron después de su adquisición utilizando el software Flow Jo (Treestar, CA). Las células inmunes vivas se identificaron y segmentaron como
10 el tinte negativo de CD45hi para células vivas/muertas, células convencionales CD4+ (CD3+CD4+Foxp3-), células CD8+ (CD3+) y las Treg (CD3+CD4+Foxp3+Helios+/-). Se utilizó una intensidad de fluorescencia media de A647 para examinar la señal fluorescente relativa y por ciento de expresión a
15 través de muestras que utilizaron muestras FMO para configurar la segmentación y controles de color simple para configurar la compensación. Los valores de datos se exportaron al software GraphPad Prism para su representación gráfica y análisis estadísticos. Los conjuntos de datos se
20 analizaron utilizando un ANOVA pareado de un extremo con corrección de Geisser-Greenhouse y la corrección de comparaciones múltiples de Dunnett o T student no pareada

como se indicó. La significancia del valor P se caracteriza como < 0.05* significativa, < 0.01** más significativa, < 0.001*** altamente significativa.

5 Ejemplo 3 Determinación de la cinética y afinidad de las interacciones GITR/IgG en diferentes especies

Este ejemplo muestra la cinética y afinidad de interacción de GITR /IgG humana, GITR/IgG de cynomolgus y GITR/IgG de ratón a 37°C con diferentes anticuerpos anti-
10 GITR. Ver Tablas 6 y 7.

Tabla 6

mAb	Cinética GITRh (37°C)				Cinética GITRc (37°C)			
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	K_D (nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	K_D (nM)
m3G7				> 100				> 100
h3G7 H1						7.8E-02	0.15	> 100
h3G7 AM	1.1E+06	1.9E-02	0.61	17	6.7E+05	8.8E-03	1.3	13
h3G7 R5	9.0E+05	4.5E-03	2.6	5.0	6.0E+05	3.8E-03	3.0	6.4
h3G7 LF	6.9E+05	1.5E-02	0.76	22	3.3E+05	2.3E-02	0.51	69
m10H2	3.5E+05	7.7E-04	15	2.2	-	7.3E-03	1.6	> 100
h10H2 HU	-	5.63E-02	0.21	> 100	-	-	-	> 100
h10H2 AM	2.33E+05	1.54E-03	7.5	6.6	-	1.1E-02	1.1	> 100

Tabla 7

mAb	Cinética GITRm (37°C)			
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	K_D (nM)
mIgG2a r18H12 anti-mGITR	2.2E+05	4.9E-04	24	2.2
mIgG2a r21B6 anti-mGITR	3.1E+05	6.5E-03	1.8	21

Todos los experimentos se hicieron en un biosensor de resonancia de plasmón de superficie Biacore T200 (GE Lifesciences, Piscataway NJ).

5 a. Interacciones de GITR /IgG humana y GITR/IgG de cynomolgus

Preparación del chip sensor

La preparación del chip sensor se realizó a 25°C con una solución amortiguadora de ejecución de HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.05% (v/v), pH 7.4. Se elaboró un chip sensor Fc anti-humano al activar todas las celdas de flujo de un chip sensor CM4 Biacore con una mezcla 1:1 (v/v) de EDC 400 mM y NHS 100 mM durante 7 minutos, a una tasa de flujo de 10 µL/min. Se diluyó un reactivo Fc anti-humano (Fc de IgG anti-humano de cabra, No. de catálogo SouthernBiotech 2081-01) a 30 µg/mL en acetato de sodio 10 mM pH 4.5 y se inyectó en todas las celdas de flujo durante 7 minutos a 20 µL/min. Todas las celdas de flujo se bloquearon con etilendiamina 100 mM en solución amortiguadora de borato 150 mM pH 8.5 durante 7 minutos a 10 µL/min.

Ensayo de cinética y afinidad

Los experimentos se realizaron a 37°C utilizando una solución amortiguadora de ejecución de HEPES 10 mM, Na Cl 150 mM, Tween 20 al 0.05% (v/v), pH 7.4, 1 mg/mL de BSA.

5 Los anticuerpos se capturaron a partir de los sobrenadantes sin diluir sobre las celdas de flujo corriente abajo (celdas de flujo 2, 3 y 4) a una tasa de flujo de 10 µL/min durante 2 minutos. Se capturaron anticuerpos diferentes en cada celda de flujo. La celda de flujo 1 se
10 utilizó como una superficie de referencia. El analito de la siguiente captura de anticuerpos (solución amortiguadora, GITRh o GITRcy) se inyectó a 30 µL/min en todas las celdas de flujo durante dos minutos. Después de la inyección del analito, la disociación se monitoreó durante 10 minutos
15 seguida por la regeneración de todas las celdas de flujo con tres inyecciones de un minuto de ácido fosfórico 75 mM. Para cada anticuerpo capturado, se realizaron las siguientes inyecciones de analitos: solución amortiguadora, GITRh 20 mM, GITRh 200 mM, GITRcy 20 mM y GITRcy 200 mM. Los ciclos de
20 solución amortiguadora se recolectaron para cada anticuerpo capturado para propósitos de doble referencia de anticuerpo capturado (doble referencia como se describe en Myszka, J.

Mol. Recognit. 12:279-284 (1999). Los sensogramas de doble referencia se ajustaron globalmente a un modelo simple de unión de *Langmuir 1:1 con transporte de masa*.

5 b. Interacciones de GITR/IgG de ratón

Preparación del chip sensor

La preparación del chip sensor se realizó a 25°C con una solución amortiguadora de ejecución de HEPES 10 mM, Na Cl 150 mM, Tween 20 al 0.05% (v/v), pH 7.4. Se elaboró un chip sensor de Fc anti-ratón al activar todas las celdas de flujo de un chip sensor CM4 Biacore con una mezcla (v/v) 1:1 de EDC 400 mM y NHS 100 mM durante 7 minutos, a una tasa de flujo de 10 µL/min. Se diluyó un reactivo de inmunoglobulina anti-ratón (anticuerpos de inmunoglobulina anti-ratón de conejo del Kit de Captura de Anticuerpos de Ratón Biacore, No. de catálogo de GE Lifesciences BR-1008-38) en 60 µg/mL de acetato de sodio 10 mM pH 5.0 y se inyectó en todas las celdas de flujo durante 7 minutos a 20 µL/min. Todas las celdas de flujo se bloquearon con etilendiamina 100 mM en una solución amortiguadora de borato 50 mM pH 8.5 durante 7 minutos a 10 µL/min.

Ensayo de cinética y afinidad

Los experimentos se realizaron a 37°C utilizando una solución amortiguadora de ejecución de HEPES 10 mM, Na Cl 150 mM, Tween 20 al 0.05% (v/v), pH 7.4, 1 mg/mL de BSA.

5 Los anticuerpos purificados se capturaron en 10 µg/mL sobre las celdas de flujo corriente abajo (celdas de flujo 2, 3 y 4) a una tasa de flujo de 10 µL/min durante 2 minutos. Los diferentes anticuerpos se capturaron en cada celda de flujo. La celda de flujo 1 se utilizó como una
10 superficie de referencia. Después de la captura del analito de los anticuerpos (solución amortiguadora o GITRm) se inyectó a 30 µL/min en todas las celdas de flujo durante dos minutos. Después de la inyección del analito, la disociación se monitoreó durante 10 minutos seguida por la regeneración
15 de todas las celdas de flujo con una inyección de 3 minutos de glicina 10 mM pH 1.7. Se analizó una serie de diluciones de GITRm de 5 miembros utilizando este método, donde la concentración superior fue de 300 nM y el factor de dilución fue de 3 veces. La dilución 33 nM se corrió por duplicado.
20 Los ciclos de solución amortiguadora se recolectaron para cada anticuerpo capturado para propósitos de doble referencia doble referencia como se describe en Myszk, J. Mol.

Recognit. 12:279-284 (1999). Los sensogramas de doble referencia se ajustaron globalmente a un modelo simple de unión de *Langmuir 1:1 con transporte de masa*.

5 **Ejemplo 4: Unión del anticuerpo GITR a las células**
T activadas y las Treg

Este ejemplo ilustra que los diferentes anticuerpos anti-GITR se unen a las células Tefectoras y las Treg activadas de modo similar con una respuesta de dosis.

10 Los anticuerpos anti-GITR se evaluaron para sus características de unión a las células T y las Treg. Para incrementar la expresión de GITR en células T de sangre periférica recién aisladas, las células T y las Treg purificadas se activaron *in vitro*. Los anticuerpos m3G7 y
 15 m10H2 de GITR mostraron una unión similar a las células T activadas como se evalúa en una intensidad media de fluorescencia de un anticuerpo de unión secundaria a los anticuerpos anti-GITR humanos (Figura 3A). Los anticuerpos R5 (h3G7R5), R9 (h3G7N9) y R13 (10H2N13) de GITR tuvieron
 20 patrones de unión similares a las Treg activadas y el anticuerpo R14 (10H2 N14) tuvo una intensidad de unión menor comparada con los otros anticuerpos (Figura 3B).

Métodos

Enriquecimiento y activación *in vitro* de las células T.

Los linfocitos primarios humanos se aislaron a partir de sangre total concentrada proporcionada por el Banco de Sangre de Stanford al diluir primero la sangre 1:4 en Solución Salina Amortiguada con Fosfato (PBS, sin Ca^{2+} y Mg^{2+}). Las Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) se aislaron utilizando una capa base de gradiente Ficoll (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA). La capa leucocitaria cosechada se lavó dos veces con PBS y se contó. Las células se suspendieron de nuevo a $50 \times 10^6/\text{mL}$ en PBS+Siero Fetal de Bovino al 2% (FBS) y se procesaron con el kit de enriquecimiento de CD3 negativas (Stem Cell Tech Vancouver, BC) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del enriquecimiento, las células se contaron y congelaron en alícuotas de $10-20 \times 10^6$ en un medio de congelación de FBS al 90% y DMSO al 10% para su uso futuro. Para la activación, se descongeló un vial de células de un donador de células T y dejó reposar durante la noche en R10c (RPMI 1640 + FBS al 10% + 1x NEAA +1x piruvato de sodio + 1x Pen-Strep) a 1×10^6 células/mL en un matraz T75. Las células se contaron y estimularon durante

48 horas con células T CD3/28 humanas Dynabeads activando las
pelotillas en una relación de perla a célula de 1:1 (Thermo
Fisher). Después de 48 horas, las células se retiraron del
medio y se lavaron con 1x PBS. Las células se titularon en
5 una placa de 96 pozos donde se tiñeron con anticuerpos anti-
GITR humano de ratón (100- 0.001 ug/mL) en PBS y se incubaron
durante 30 minutos a 37 °C. El anticuerpo sin unir se lavó de
las células y se utilizó un APC etiquetado con el fragmento
específico Fc gamma (Fcγ) de IgG F(ab')₂affiniPure anti-ratón
10 de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West
Grove, PA) para detectar el anticuerpo de fracción primaria.
Después de la tinción secundaria, la placa se lavó con 1x PBS
y se centrifugó a 335xg (1200 rpm). Los pozos se suspendieron
de Nuevo en PBS + PBS al 2% y se adquirieron en HTS.

15

Clasificación y expansión de las Treg primarias

El aislamiento y expansión de Treg se basó en el
protocolo de Putnam *et al.* (Diabetes. 58(3):652-62 (2009)).
Específicamente, los linfocitos humanos primarios se aislaron
20 a partir de sangre total concentrada proporcionada por el
Banco de Sangre de Stanford al diluir primero sangre 1:4 en
Solución Salina Amortiguada con Fosfato (PBS, sin Ca²⁺ y

Mg²⁺). Las Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) se aislaron utilizando una capa base de gradiente Ficoll (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA). La capa leucocitaria cosechada se lavó dos veces con PBS y se contó. Las células se suspendieron de nuevo a 50*10⁶c/mL en PBS + Suero Fetal de Bovino al 2% (FBS) y se procesaron con el kit de enriquecimiento de CD4 negativas (Stem Cell Tech Vancouver, BC) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del enriquecimiento, las células se contaron y prepararon para la clasificación FACS.

La solución amortiguadora de tinción de Treg se preparó como PBS con Suero de Ratpon Normal al 2% (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA) y Suero Ab Humano al 2% (Corning CellGro, Manassas, VA). Las células enriquecidas con CD4 negativas se tiñeron durante 30 minutos a T.A. en solución amortiguadora de tinción de Treg con CD3, CD4, CD8, CD25 y CD127 diluidas 1:50, excepto las CD25 que se tiñeron diluidas a 1:12.5. Todos los anticuerpos se proporcionaron por BD. (CD3-APC (UCHT1), CD4:PacBlue (RFP-T4, BD26986), CD8:BV786 (HIT8a, BD555635), CD127:PECy7 (M21, BD650822), CD25:PE (2A3, BD340938). Después de la tinción,

las células se lavaron y suspendieron de nuevo en 50×10^6 c/mL en solución amortiguadora de Treg. Se corrió la clasificación FACS en la plataforma Aria (BD Biosciences, San Jose, CA). Las Treg, identificadas por su firma fenotípica de CD3+CD4+CD25^{hi}CD127^{lo} bajo, se clasificaron con FACS y verificaron para un 98% + pureza al adquirir una fracción pequeña de la muestra clasificada. Las células apropiadas se corrieron a través de una segunda clasificación para maximizar la pureza.

Las células de la clasificación FACS se contaron y suspendieron de nuevo a 0.25×10^6 c/mL en un medio de expansión de Treg compuesto del Instituto Memorial park Roswell (RPMI)-1640 suplementado con suero AB Humano al 5% y 1 x MEM-NEAA, piruvato de sodio y Penicilina-Estreptomicina (LifeTechnologies, San Diego, CA) con perlas expansoras de Treg 1:1 (Life Technology, San Diego, CA). Después de dos días, el volumen medio se duplicó y se agregó IL-2 humana recombinante en 300 UI/mL. En los días 5, 7 y 9 las células se contaron y subcultivaron en 0.25×10^6 c/mL con 300 UI/mL de IL2. Además del subcultivo en el día 9, se agregaron perlas expansoras de Treg 1:1 al cultivo para "estimular de nuevo"

las Treg. En el día 13, las células se cosecharon para ensayos funcionales y de unión.

Fenotipo de las Treg expandidas primarias

5 Las Treg cultivadas serían rastreadas a través de toda la expansión para verificar la pureza. Las células se suspendieron de Nuevo en una solución amortiguadora FACS, PBS con FBS al 2% para su análisis utilizando marcadores de CD conjugados con fluoróforo. Los anticuerpos FACS contra GITR y
10 otros marcadores de CD de linfocitos se prepararon en una solución amortiguadora FACS a la concentración apropiada y se incubaron durante 30 minutos a T.A. La tinción de la pureza de Treg utiliza objetivos intracelulares y se procesaron con el kit de fijación/permanencia Foxp3 (Affymetrix/eBiosciense,
15 San Diego, CA). Las células teñidas se suspendieron de nuevo en solución amortiguadora FACS recién preparadas y se analizaron en un analizador FACS LSRII o Fortessa (BD Biosciences, San Jose, CA). Para generar los datos cinéticos y de unión, el anticuerpo sin conjugar se tituló a partir de
20 10^{-0.001}ug/mL (en diluciones en serie 1:10, pozos por triplicado por concentración) y se incubaron a 4c durante 60 minutos con 1*10⁵ de las Treg expandidas el día 12 por pozo.

El anticuerpo sin unir se lavó de las células y se utilizó un A647 etiquetado con un fragmento específico de Fc gamma (Fcγ) de IgG F(ab')₂ affiniPure anti-humano de cabra para detectar el anticuerpo de unión (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA). Análisis de células teñidas completado con FlowJo (Treestar). Se utilizó la media geométrica de APC para calcular la EC50 mediante la transformación logarítmica de la concentración molar y generar una curva de ajuste no lineal en GraphPad Prism.

10

Ejemplo 5: Los anticuerpos de GITR median la citotoxicidad celular

Este ejemplo muestra que los anticuerpos de GITR median la citotoxicidad celular en dos ensayos *in vitro*: 1) citotoxicidad celular mediada por el anticuerpo (ADCC) mediada por las PBMC no fraccionadas y 2) fagocitosis celular mediada por el anticuerpo (ADCP) mediada por macrófagos.

Los anticuerpos m3G7 y m10H2 de IgG1h anti-GITR mostraron niveles similares de ADCC de una línea de células T GITR+ comparados con el isotipo de control, con un exterminio máximo de células objetivo a 0.01μg/ml de 78.5% para m3G7 y de 83.4% para m10H2 (Figura 4A)

20

Los macrófagos asociados al tumor (TAM) se han implicado como la citotoxicidad dirigida por el anticuerpo que media la población celular de las Treg en ratones (Simpson et. al. J. Exp. Med. 210(9): 1695-1710 (2013);
 5 Bulliard et. al. J. Exp. Med. 210(9): 1685-93 (2013)). Se evaluó la citotoxicidad mediada por el anticuerpo GITR de una línea celular de células T GITR+ por macrófagos derivados de monocitos humanos. Los anticuerpos de IgG1h de GITR habilitan a los macrófagos a mediar un exterminio de células T GITR+
 10 dependiente de la dosis (Figura 4B). Los anticuerpos de GITR no fueron equivalentes; los anticuerpos h3G7 R5 ("R5"), h3G7 R9 ("R9"), h10H2 R13 ("R13") y h10H2 R14 ("R14"), tuvieron una EC50 de 919.7, 692.2, 4450. 2013 pM, respectivamente. La citotoxicidad mediada por macrófagos fue dependiente de la Fc
 15 del anticuerpo GITR. La actividad citotóxica se perdió con la mutación N297A que redujo la unión a FcR (Chao et al. Immunol. Invest. 38(1): 76-92 (2009)). (Figura 4C).

Métodos

20 Ensayo ADCC con PBMC efectoras y GITR+ objetivo

Los linfocitos humanos primarios se aislaron a partir de la sangre total concentrada proporcionada por el

Banco de sangre de Stanford al diluir primero la sangre 1:4 en Solución salina amortiguada con fosfato (PBS, sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}). Las Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) se aislaron utilizando una capa base de gradiente Ficoll (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA). La capa leucocitaria cosechada se lavó dos veces con PBS y se contó. Las PBMC se suspendieron de nuevo a 3×10^6 células/mL en RPMI suplementado con FBS al 10% y 1 x MEM-NEAA, piruvato de sodio y Penicilina-Estreptomicina (Life Technologies, San Diego, CA). La línea de células T de Jurkat GITR+ se tiñó en PBS con Violeta de Traza Celular (Life Technologies, San Diego, CA). Después del etiquetado, las células de Jurkat se suspendieron de nuevo a 3×10^5 c/mL. Se hicieron series de diluciones de los anticuerpos anti-GITR al titular 1:10 de 40ug/mL a .0004ug/mL de una solución (6 concentraciones). Se sembraron en placas 50uL de un anticuerpo titulado por pozo de una placa con fondo tipo U de 96 pozos junto con 50uL de las células de Jurkat etiquetadas y 100uL de PBMC para crear una relación efectora a objetivo de 20:1 con un anticuerpo final [10-.0001ug/mL]. Las placas se incubaron durante la noche (~18 horas) y al siguiente día las placas se cosecharon para su análisis.

Las placas con pozos tipo U se centrifugaron a 1200 rpm para eliminar el medio de las células y se lavaron con PBS. Se agregó PI (Life Technologies, San Diego, CA) en PBS a 1:500 en 30 uL por pozo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al PI se agregaron aproximadamente 100 µl de PBS suplementado con FBS al 2% (para extinguir el PI) en un volumen de 100-150 uL por pozo en un análisis previo de HTS. Justo antes de la adquisición, 1×10^4 se agregaron a cada pozo perlas de conteo Count Bright (Life Technologies, San Diego, CA). La relación del conteo objetivo de Treg viables a perlas de centeno podría utilizarse para normalizarse a través de la placa y compararse con la relación de IgG1 de control para generar el por ciento de citotoxicidad.

15 Ensayo ADCP: Monocitos derivados de macrófagos efectores y Treg objetivo expandidas

Las PBMC se prepararon como se describe anteriormente. Al utilizar el kit de enriquecimiento de cCD4+ negativas EasySepTM (Stem Cell Tech Vancouver, BC), los monocitos se enriquecieron de forma positiva y se suspendieron de nuevo en R10c suplementado con 20 ng/mL de MCSF (R&D systems, Minneapolis, MN) en 1×10^6 células/mL y se

sembraron en placas T175 con 55-65 mL de suspensión celular por matraz. Los monocitos se adhirieron fuertemente al matraz de cultivo tisular y no se retiraron cuando recién se preparó el medio con R10c nuevo suplementado con 20 ng/mL de MCSF en el día 2 y en el día 5 de cultivo. El medio en el día 5 también se suplementó con 10 ng/mL de IL10 (R&D systems, Minneapolis, MN). Después de una semana del cultivo, las células se cosecharon y sembraron en placas a 1×10^5 células/pozo en placas planas de 96 pozos en un medio de activación que consistía de 1 mg/mL de PGE2 (Sigma, St Louis, MO), 10 ng/mL de cada uno de TNF, IL1B y IL6 (todos de R&D systems, Minneapolis, MN). Al siguiente día, los monocitos sembrados en placas se lavaron fuera del medio de activación y se agregaron por pozo 5×10^4 células de Jurkat GITR+ por volumen etiquetadas con Células con Violeta traza (para una relación de células efectoras a objetivo de 2:1) junto con ya sea el anticuerpo de IgG1 de control o los anticuerpos GITR titulados. Las placas se incubaron durante la noche (~ 18 horas) y al siguiente día, las placas se cosecharon para su análisis. Las células de las placas planas de 96 pozos se titularon completamente y transfirieron a placas con pozos tipo U de 96 pozos. La placa se centrifugó a 1200 rpm para

retirar el medio de las células y se lavó con PBS. El resto del procedimiento sigue en la sección de Adquisición y Análisis de ADCC que comienza con la tinción de PI.

5 **Ejemplo 6: Intensificación de la producción de**
citocinas de células T por los anticuerpos GITR

El ejemplo muestra que los anticuerpos anti-GITR de la presente invención intensifican la producción *in vitro* de citocinas de células T.

10 GITR es un receptor de co-estimulación en las células T. La ligadura de GITR con su ligando provoca una proliferación intensificada de células T auxiliares diferenciadas (Tone et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 100(25): 15059-15064 (2003)). La activación de células T impulsadas y
15 producción pro-inflamatoria de citocinas, tales como IFN γ se traduce a la regresión del tumor en modelos de ratón (Ko et. al. J. Exp. Med. 2005. 202(7): 885-891 (2005). En este ejemplo, se evaluaron los anticuerpos de GITR para la activación de células T mediante la secreción de IFN γ y TNF α .
20 Se activó un hibridoma de células T (3A9; Dustin et al. J. Immunol. 157(5):2014-2021 (1996)) que expresa GITR humano se activó con un anticuerpo anti-CD3 (Clone 2C11, Ebioscience) y

las concentraciones incrementadas de la placa inmovilizaron los anticuerpos anti-GITR (h3G7 R5 ("R5"), h3G7 R9 ("R9"), h10H2 R13 ("R13") y h10H2 R14 ("R14")). Los cuatro anticuerpos de GITR provocan una secreción intensificada de TNF α de una manera dependiente de la dosis hasta 0.01 - 0.1 μ g/ml. A concentraciones mayores del anticuerpo GITR, cayó la secreción de TNF α (Figura 5A). Un experimento similar se llevó a cabo con las células 3A9 que expresan GITR y anticuerpos 2C11 CD3 en presencia de una línea de linfoma de células B (LK35.2) para proporcionar las FcR necesarias para el agrupamiento y señalización de GITR (Zhou et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 105(14): 5465-5470 (2008)). Los anticuerpos R5, R9, R13 y R14 de GITR se agregaron en solución y los cuatro intensificaron la secreción de TNF α entre las concentraciones de 0.01 y 10 μ g/ml (Figura 5B).

El efecto de los anticuerpos de GITR sobre la secreción de citocinas de las células T primarias activadas se evaluó *in vitro*. Los anticuerpos R5, R9, R13 y R14 de GITR provocaron incrementos dependientes de la dosis en IFN γ y TNF α secretados en los picos de las células Y CD4+ y CD8+ entre 0.01 y 0.1 μ g/ml y después cayeron a concentraciones mayores (Figura 5C y Figura 5D). En consecuencia, este

ejemplo muestra que los anticuerpos de GITR tienen atributos de activación de células T que son dependientes de la dosis.

Métodos

5 Ensayo del agonista de células T del anticuerpo GITR

Para preparar placas de cultivo con el anticuerpo GITR inmovilizado, se recubrieron placas estériles de 96 pozos planos Nunc maxisorp durante la noche en 4°C con 100 uL de 2 ug/mL de la proteína específica de FC Anti-Ratón y Anti-Humano diluida en PBS. Después de lavar 2x con 1x PBS, se incubaron 100 uL de CD3 de ratón (2C11) en 10 ng/mL a 37 °C durante 60-90 minutos. Los anticuerpos R5, R9, R13 y R12 de GITR se titularon de 10-0.0001 ug/mL en PBS y se agregaron 100 uL a cada pozo por triplicado para cada concentración. La placa se incubó a 37 °C durante 60-90 minutos y se lavó antes de agregar las células.

Al utilizar las placas preparadas con GITR inmovilizado, se sembraron en placas 50,000 células 3A9 GITR humano+ por pozo en 200 uL de medio DMEM + FBS al 10%. Después de 48 horas de cultivo, los sobrenadantes se recolectaron para el análisis de citocinas utilizando el Ensayo de Proteína Soluble de Ratón (Becton-Dickinson).

Las células 3A9 GITR humano+ también se probaron en un ensayo de anticuerpo GITR soluble utilizando LK35.2, una línea de linfoma de células B de ratón. En este ensayo, se sembró en placas una relación 2:1 de 3A9 a LK35.2 junto con el anticuerpo anti-CD3 de ratón (2C11) en 0.1 ug/mL y anticuerpos de GITR titulados de 10^{-0.0001} ug/mL.

También se evaluó la secreción de citocinas humana utilizando células T marcadoras aisladas recientemente de células T humanas marcadoras (CD4+CD8+) y sembrarlas en placas sobre las placas inmovilizadas preparadas como se describe anteriormente. Se sembraron en placas 100,000 células por pozo en RPMI+ FBS al 10% y los sobrenadantes se recolectaron después de 4 días de incubación.

Ejemplo 7: Tinción inmunohistoquímica de GITR

Este ejemplo describe la optimización de un anticuerpo anti-GITR como un reactivo de inmunohistoquímica (IHC) que tiñe específicamente los tejidos embebidos en parafina y fijos en formalina (FFPE).

Se evaluó el anticuerpo m10H2 anti-GITR humano y mostró una densidad correlacionada de tinción de las líneas de células T que mostraban la expresión baja y alta o sin

expresión de GITR humano (Figura 6 A, Figura 6 B y Figura 6C). La confirmación de la expresión mínima, baja y alta de GITR se muestra mediante la tinción por citometría de flujo de la proteína de superficie con el clon m10H2 (Figura 6D) y
5 PCR cuantitativa y normalización con la expresión de actina B (Ejemplo 6E). Además, los tejidos FFPE aislados de tumores de NSCLC se tiñeron con m10H2 (Figura 6F) o el anticuerpo de isotipo de control (Figura 6G). La tinción de m10H2 se confinó a la membrana de las células dentro del infiltrado
10 mononuclear en el tejido de tumor (Figura 6F). En consecuencia, este ejemplo demuestra que m10H2 es un anticuerpo anti-GITR validado que puede utilizarse en los tejidos FFPE para cuantificar la expresión de GITR.

15 Métodos

Tinción de superficie en las líneas de las células de Jurkat que sobreexpresan GITR:

Antes del análisis IHC, las tres líneas de Jurkat se analizaron para la expresión de GITR de superficie por
20 FACS utilizando un anticuerpo m10H2 etiquetado con A647. Estas líneas incluyeron una línea de células de Jurkat progenitoras, así como dos líneas generadas por la

transfección de un plásmido de GITR en las células de Jurkat progenitoras. Se tiñeron aproximadamente 5×10^6 células de cada línea con el anticuerpo etiquetado a una concentración de 1 ug/mL. Después de la tinción, las células se lavaron desde el anticuerpo sin unir utilizando 1x PBS y se analizaron por FACS.

Resultados

Mediante FACS, las células de Jurkat progenitoras no tuvieron una expresión de GITR detectable mientras que las dos líneas transducidas tuvieron una tinción positiva. Hubo aproximadamente un logaritmo y medio pliegue de diferencia entre la expresión media de GITR de las dos líneas que llevaron a distinguirlas como una expresión baja de GITR+ y una expresión alta de GITR+.

Análisis de expresión de GITR cuantitativo mediante qPCR:

El análisis cuantitativo de la expresión de GITR en las células de Jurkat progenitoras, GITR+ bajo y GITR+ alto se corrió mediante qPCR. El ARN se aisló a partir de 5×10^6 células de cada línea utilizando el mini kit RNeasy Mini (Quiagen). Se elaboró una plantilla de ADNc utilizando

200 ng de ARN aislado al utilizar el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Thermo Fisher). Se utilizaron los reactivos TaqMan FAST para correr la qPCR junto con la plantilla de ADNc. Los cebadores para ambos genes de limpieza de Actina B (Hs99999903_m1) y un cebador GTR específico personalizado se corrieron en cada reacción. El cebador GTR personalizado se generó por ABI al utilizar la secuencia del vector del plásmido transfectado con GTR (secuencia no descrita por ABI). La qPCR se corrió en un Sistema Viia7 de acuerdo con las instrucciones del fabricante y las especificaciones de ciclado térmico TaqMan FAST. El Ct delta se calculó utilizando la fórmula: $2^{-(\text{Ct}(\text{GTR}) - \text{Ct}(\text{ActB}))}$.

15 Resultados

El análisis qPCR confirma que la expresión clasificada de las tres líneas con GTR+ bajo tuvieron 2.7 logaritmos de expresión mayor que la progenitora y la línea con GTR+ alto fue 2 logaritmos de expresión mayor de GTR que la línea con GTR+ bajo.

Procesamiento IHC de las células:

Con los niveles de expresión de GITR evaluados por FACS y qPCR, las líneas de células de Jurkat progenitoras (negativas a GITR), GITR+ bajo y GITR+ alto se prepararon y procesaron para seccionarlas como sigue. Se recolectaron
5 entre 20 y 30*10e6 células en un matraz cónico de 50 mL y se centrifugaron a ~750xg durante 10 minutos. Después de retirar el sobrenadante, la pelletilla se transfirió a un matraz cónico de 15 mL en una solución amortiguada neutra de formalina al 10% y se centrifugó a ~750xg durante 10 minutos.
10 Se preparó HistoGel a 50 °C y se mezcló con la pelletilla celular y se dejó enfriarse por refrigeración a 4 °C. La pelletilla de células con HistoGel entonces se transfirió en solución amortiguada neutra de formalina al 10% para su fijación durante >12 horas y se transfirió a un casete para
15 embeberla en parafina. Se realizó el seccionado de los portaobjetos para generar secciones de pelletillas a un espesor de 4 uM. Para la tinción IHC, se utilizó UltraVision One Detection System de Thermo Scientific. Brevemente, los portaobjetos se prepararon al hornearlos a 60 °C durante una
20 hora y se les quitó la parafina en tres rondas de lavado con xileno durante tres minutos cada una. La pelletilla seccionada se hidrató de nuevo por incubaciones secuenciales de dos

minutos cada una en EtOH al 100% (2x), EtOH al 95% (1x), EtOH al 70% (1x) y PBS (1x). la recuperación del antígeno se realizó al procesar los portaobjetos durante 5 minutos en solución amortiguadora DIVA y la cámara de desacoplamiento (ambos de Biocare Medical) se calentaron a 110°C y se presurizaron a 5 PSI seguidos por dos lavados en PBS. Los portaobjetos se bloquearon en H₂O₂ al 3% (Peroxidasa) durante 10 min y se lavaron en PBS. El anticuerpo m10H2 primario se diluyó en 1 ug/mL de solución de bloqueo y los portaobjetos se incubaron durante la noche a 4°C. Después de lavar en PBS (3x) durante 3 minutos, los portaobjetos se incubaron en Polímero HRP durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron en PBS (3x). El reactivo DAB se prepare y los portaobjetos se expusieron durante 5 minutos. Se corrió una contratinción con Hematoxilina y después de la deshidratación, los portaobjetos montados estuvieron completos. Los portaobjetos se analizaron para los niveles de GTR.

20 Tinción de las muestras de NSCLC

Los portaobjetos preparados de muestras de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) se

recibieron de un banco interno. El UltraVision One Detection System de Thermo Scientific se utilizó como se describe anteriormente. Como con la tinción de las pelotillas celulares, se evaluó 1 ug/mL del anticuerpo m10H2 anti-GITR
5 junto con un anticuerpo de control de IgG1 de ratón a 5 ug/mL.

Ejemplu 8: Actividad anti-tumor de los anticuerpos de GITR

10 Este ejemplo muestra que los anticuerpos anti-ratón de GITR con un isotipo de IgG2am tuvieron una actividad reductora del crecimiento de tumor en un modelo de tratamiento terapéutico del carcinoma de colon CT26.

La IgG2am refleja más estrechamente el isotipo de
15 IgG1 humana que puede mediar la actividad de ADCC mientras que el isotipo de IgG1m se asemeja más estrechamente a IgG2ah que tiene una actividad ADCC mínima (Nimmerjahn y Ravetch, Science, 310: 1510-1512 (2005)).

El isotipo 21B6 de IgG2am del anticuerpo anti-GITR
20 tuvo una actividad anti-tumor mientras que el isotipo IgG2am del anticuerpo de control no (Figura 7A-Figura 7D). El 21B6 de IgG2am mostró 95%, 94%, 102% de inhibición de crecimiento

de tumor a 0.2, 1 y 5 mpk (mg/kg), respectivamente (Tabla 8, Figura 7A - Figura 7D). El isotipo de IgG1m indujo 33%, 9% y 22% de inhibición de crecimiento de tumor a 0.2, 1 y 5 mg/kg, respectivamente (Tabla 9, Figura 7E - Figura 7H). Al término del estudio (43 días después de la dosis inicial), 80% (8/10) de los ratones sobrevivieron en el grupo con 5 mpk de IgG2am, mientras que 44.4% (4/9) sobrevivieron en el grupo con 1 mg/kg de IgG2am y 40% (4/10) sobrevivieron en el grupo con 0.2 mg/kg de IgG2am (Tabla 8 y Tabla 9, Figura 7I). El tratamiento con IgG1m resultó sin sobrevivientes; todos necesitaron sacrificarse debido a la carga tumoral al término del estudio (43 días) (Tabla 8 y Tabla 9, Figura 7I).

Tabla 8

15

Dosis	TGI	% libre de tumor
5 mpk	102.25	80%
1 mpk	94.17	44.44%
0.2 mpk	95.30	40%

Tabla 9

Dosis	TGI	% libre de tumor
5 mpk	21.76	0
1 mpk	8.70	0
0.2 mpk	33.19	0

5 La inhibición del crecimiento de tumor mediada por 21B6 de IgG2a se correlacionó con un incremento en la relación de CD8:Treg que infiltran el tumor (Figura 7J). La dosis de 1 mg/kg de 21B6 de IgG2a resultó en la relación más alta de CD8:Treg (10.9 X isotipo de control de IgG2a, p=

10 0.049). El tratamiento con 21B6 de IgG2a también resultó en un incremento de la relación de Teff CD4:Treg que infiltran el tumor (Figura 7K) en todas las dosis con la dosis de 0.2 mg/kg de 21B6 de IgG2a proporcionando la relación media más alta (4.7 X mayor que el isotipo de control de IgG2a). Se

15 observó significancia estadística entre 5 mg/kg, 1 mg/kg y 0.2 mg/kg comparadas con el isotipo de control de IgG2a con valores p de 0.043, 0.003 y <0.0001, respectivamente. Estos cambios no se observaron en los ratones tratados con el 21B6 de IgG1 donde las células T CD8:Treg y células Teff CD4:Treg

20 no mostraron significancia estadística comparadas con el isotipo de control de IgG1 (Figura 7J y Figura 7K).

La inhibición de crecimiento de tumor correspondió con una pérdida de las Treg intratumorales de los ratones tratados con 21B6 de IgG2a (Figura 7L). Todos los niveles de dosis de 21B6 de IgG2a redujeron el número de células Treg por gramo asociado con el tumor primario, aunque estos cambios no hayan sido estadísticamente significativos. Hubo reducciones de células T CD8+ a 5 mg/kg (Figura 7M) y de células T efectoras (Teff) CD4+ en 5 mg/kg y 1 mg/kg (Figura 7N), aunque estos cambios no fueron estadísticamente significativos. De forma similar, todas las dosis de 21B6 de IgG2am redujeron la proporción de las Treg de 2.56% dentro de las células inmunes CD45+ que infiltraron los tumores a 0.69% ($p = 0.0018$) con la dosis de 0.2 mg/kg a 0.42% ($p = 0.0005$) con la dosis de 1 mg/kg y a 1.29% ($p = 0.0287$) con la dosis de 5 mg/kg (Figura 7O). La proporción de Treg en el infiltrado inmune no se afectó por el tratamiento con 21B6 de IgG1m (Figura 7O). Los cambios en la proporción de células T CD8+ y células Teff CD4+ en el infiltrado de tumor no fueron significativos (Figura 7P y Figura 7Q). Juntos, estos análisis sugieren un conteo reducido de las Treg de tumor para las células T efectoras intensificadas: relación de Treg, eficacia anti-tumor y supervivencia de los ratones

después de la administración del anticuerpo de GITR, que fue dependiente en una IgG2a y no en un isotipo Fc de IgG1m.

Las frecuencias del subconjunto de células T se evaluaron en un compartimento inmune periférico; los bazo
 5 del tumor que lleva en ratones tratados con 21B6. La dosis de 0.2 mg/kg tuvo el mismo efecto, reduciendo las Treg de ratones tratados en 2.46% de células CD45+ con el anticuerpo de control a 1.11% ($p = 0.0006$) en ratones tratados con IgG2a y redujo las Teff CD4+ de 15.06% de las células CD45+
 10 de ratones tratados con el anticuerpo de control a 11.22% ($p = 0.0121$) en ratones tratados con IgG2a (Figura 7R y 7T). Los cambios de otras dosis no fueron significativos. Las células T CD8+ no se afectaron en ninguna dosis (Figura 7S).

15 Métodos

Clonación y Expresión de 21B6m de IgG2a

Se obtuvieron las secuencias de AND del dominio variable de cadena pesada de 21B6 anti-GITRm a partir del ADNc generado utilizando RT-PCR a partir de una fusión de
 20 hibridoma de Ratas Lewis. La secuencia de aminoácidos traducida resultante se optimizó con el codón para la expresión de células epiteliales 293 de riñón humano

utilizando algoritmos de propiedad de Thermo Fisher Scientific Geneart. Los dominios variables del codón sintetizado y optimizado entonces se clonaron en los vectores de expresión pARC Ig2am y pARC Kappam de mamífero utilizando
5 BssHII/BstEII y ApaLI/PacI, respectivamente. Los clones correctos para los constructos de las cadenas ligera y pesada fueron confirmados por secuencia y se nombraron 3G7R5h -VL y 3G7R5h -VH de modo correspondiente.

10 Expresión y purificación del anticuerpo

Una relación en masa de 1:1 de los plásmidos 3G7R5h -VL y 3G7R5h-VH se co-transfectó en células Expi293 utilizando un protocolo de transfección a base de PEI (0.5 mg de cada plásmido por 2 millones de células). Cinco días
15 después de la transfección, el cultivo celular transfectado se cosechó, centrifugó y filtró utilizando una membrana de 0.2 μ M. El sobrenadante filtrado entonces se purificó utilizando la cromatografía de afinidad de la Proteína A (MabSelect Sure, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA)
20 y después se dimensionó para retirar la proteína agregada (Superdex S200 26/60 GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh,

PA). El análisis SDS-PAGE junto con el de Biacore identificaron las fracciones de proteína activa monomérica.

Modelo de tumor singénico: CT26

5 Animales

Las cohortes de ratones BALB/c hembras (BALB/cAnNCrl) de 7 semanas de edad obtenidos de Jackson Laboratories (Bar Harbour, ME) y alojados en una instalación libre de patógenos en Pfizer (Sur de San Francisco, CA) de acuerdo con el protocolo del Comité Institucional de Uso y Cuidado de los Animales (IACUC). Los animales tenían 8 semanas de edad cuando se iniciaron en el experimento.

Cultivo celular

15 Las líneas CT26 de carcinoma de colon de ratón (CRL-2638) se obtuvieron de la Colección Americana de Tipos de Cultivo (ATCC, Manassas, VA). Las células se propagaron en un medio básico recomendado que contenía FBS al 10% y solución de penicilina-estreptomicina al 1% (todas de Thermo
20 Fisher Scientific, Waltham, MA). Las células se cosecharon con TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y se lavaron con 2x el volumen del medio que contenía suero

antes de peletizar las células. La pelotilla se suspendió de nuevo en un medio básico sin suero y se realizó un conteo celular y verificación de la viabilidad. Las células CT26 se llevaron a una concentración de 2×10^6 células por mL en un medio básico para inyección.

Protocolo experimental *in vivo*

Para establecer los tumores, se inyectaron 100 uL de suspensión celular SC en el costado derecho de los ratones. Los implantes se monitorearon hasta que los tumores alcanzaron un volumen promedio de aproximadamente 80 mm³ y se aleatorizaron en grupos de ratones que tenían volúmenes de tumor promedio y EEM casi iguales. El anticuerpo 21B6 se preparó para una dosificación de 5, 1 y 0.2 mg/kg con un isotipo de control de IgG1 (clon MOPC-21) y 5 mg/kg del isotipo de control de IgG2 (C1.18.4, Bioxcell, West Lebanon, NH). El tratamiento comenzó el día de la aleatorización (Día 0). Los ratones se pesaron y dosificaron con IP cada 2-3 días durante un total de tres dosis.

20

Evaluación del crecimiento del tumor

Dos veces a la semana podía tomarse la longitud y ancho del tumor (en unidades milimétricas) con calibradores digitales (Mitutoyo, Aurora, IL). Los volúmenes de tumor se calcularon utilizando los valores de longitud y ancho con la
5 fórmula: $V = \frac{1}{2} L \times W^2$, donde L (longitud) se define como el diámetro más largo del tumor y W (ancho) es perpendicular a L. Las mediciones de eficacia continuaron hasta el día 20 y los ratones continuaron monitoreándose hasta 40 días para el análisis de sobrevivencia.

10

Análisis TIL de tumor y especnocios

El tumor y el bazo se disectaron de 4-5 ratones por grupo un día después de la última dosis. Los tumores se disociaron con el programa IMP-002 de Octeto Miltenyi
15 (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los bazos se disociaron manualmente sobre un filtro con malla de 70 μ M y los glóbulos rojos se lisaron con una solución amortiguadora ACK (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Ambas poblaciones de células
20 se lavaron con PBS y se tiñeron con los siguientes anticuerpos etiquetados con fluorescencia para el análisis FACS:

LIVE/DEAD (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), CD90.2, CD4 y CD8 todos de BD Biosciences, y GITR y CD45 de eBioscience. Después de la tinción extracelular durante 30 minutos a 4 °C, las células se lavaron con PBS + FBS al 2% y se procesaron con el kit de fijación/permanencia Foxp3 eBioscience (eBioscience, San Diego, CA) según instrucciones del fabricante. Las células se tiñeron con marcadores intracelulares Foxp3-eFlour450 (eBioscience, San Diego, CA) y Ki-67-BV605 (BD Biosciences, San Jose, CA). El análisis de subconjuntos de células T se llevó a cabo en FlowJo (FlowJo, Ashland, OR) y se graficó utilizando el software GraphPad Prism.

Ejemplo 9 Terapia de combinación utilizando un anticuerpo anti-GITR y otro agente terapéutico

Este ejemplo describe la evaluación del anticuerpo 21B6 de IgG2am anti-GITR subrogado en combinación con otros anticuerpos inmuno-dirigidos para el tratamiento terapéutico de los tumores.

El modelo de carcinoma de colon CT26 se sometió a una regresión de tumor complete con un solo agente de 21B6 de IgG2a (Ejemplu 8), a modo que el modelo de melanoma B16F10 se

evaluara debido a que es menos sensible a la terapia inmuno-
dirigida con un solo agente (Ver, por ejemplo, Mosley et al.,
Cancer Immunology Research, 5(1)29-41 (2017)). El protocolo
de tratamiento fue similar al estudio descrito en el Ejemplu
5 8: los tumores B16F10 se implantaron y una vez que alcanzaron
un tamaño promedio de 80 mm³ se aleatorizaron y trataron con
3 dosis de 1 mg/kg de 21B6 de IgG2a y la dosis eficaz
establecida del IP progenitor de combinación cada 2-3 días
para un total de tres dosis. Todos los dobletes de
10 combinación del anticuerpo 21B6 de IgG2a anti-GITR con los
anticuerpos anti-PD-L1, anti-4-1BB, anti-OX40 y anti-PD-1
mostraron mejorar la inhibición de crecimiento del tumor en
comparación con cualquier tratamiento con un solo agente
simple.

15 Estos datos mostraron que los anticuerpos anti-GITR
de la presente invención pueden combinarse con inhibidores de
punto de control inmune o anticuerpos estimuladores de
células T para los efectos inhibidores mejorados del
crecimiento de tumor.

20 Aunque las enseñanzas divulgadas se han descrito
con referencia a diversas aplicaciones, métodos, kits y
composiciones, se apreciará que pueden hacerse diversos

cambios y modificaciones sin apartarse de las enseñanzas de la presente y la invención reivindicada a continuación. Los ejemplos anteriores se proporcionan para ilustrar mejor las enseñanzas descritas y no pretenden limitar el alcance de las enseñanzas presentadas aquí. Mientras que las presentes enseñanzas se han descrito en términos de estas modalidades ejemplares, el técnico experimentado entenderá fácilmente que son posibles diversas variaciones y modificaciones de estas modalidades ejemplares sin la experimentación indebida. Todas de tales variaciones y modificaciones se encuentran dentro del alcance de las enseñanzas actuales.

Todas las referencias citadas en la presente, incluyendo patentes, solicitudes de patente, documentos, libros de texto y similares y las referencias citadas en la presente en el grado en que ya no se incorporen en la presente para referencia en su totalidad. En el caso de que una o más de la literatura y materiales similares difieran o contradigan esta solicitud, incluida pero no limitada a términos definidos, utilidad del término, técnicas descritas o lo similares, esta solicitud controla.

La descripción y Ejemplos anteriores detallan ciertas modalidades específicas de la invención y describen

el mejor modo contemplado por la invención. Sin embargo, se apreciará que no importa qué tan detallada pueda aparecer en el texto anterior, la invención puede practicarse de muchas maneras y la invención deberá interpretarse de acuerdo con
5 las reivindicaciones anexas y cualesquier equivalentes de las mismas.