

PC072865A

ANTICUERPOS ANTI-TNFR2 Y MÉTODOS DE USO DE ESTOS

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS

5 “La presente solicitud contiene un listado de secuencias que ha sido presentado electrónicamente en formato .xml y que por la presente se incorpora por referencia en su totalidad. Dicha copia .xml, creada el 5 de mayo de 2023 se denomina PC072865 Sequence Listing.xml y tiene un tamaño de 42.322 bytes”.

10

ANTECEDENTES

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a TNFR2 y composiciones, métodos y usos de estos, incluyendo el uso de anticuerpos de la divulgación para tratar enfermedades de autoinmunidad y autoinflamación. La presente invención también se refiere a moléculas relacionadas, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican tales composiciones de anticuerpos, y métodos relacionados, por ejemplo, métodos para producir y purificar tales anticuerpos y anticuerpos 15 biespecíficos, y su uso en diagnóstico y terapéutica.

El TNF es una citocina pleiotrópica que se expresa en la superficie celular de los leucocitos y posteriormente se libera a través de la actividad de varias enzimas proteolíticas. Las respuestas celulares al TNF están mediadas por dos receptores, el TNFR1 (TNFRSF1A), que se expresa de forma ubicua y media en las respuestas proinflamatorias, y el TNFR2 (TNFRSF1B), que se expresa de forma más selectiva en subtipos específicos de leucocitos y parece mediar predominantemente en los efectos inmunorreguladores (Salomon 2021). El TNF soluble puede activar ambos receptores, pero el TNFR2 es activado preferentemente por el TNF asociado a la membrana. Entre las actividades atribuidas al agonismo del TNFR2, las más relevantes para la terapia de afecciones autoinmunes y autoinflamatorias son la expansión de los linfocitos T reguladores, la muerte celular inducida por la activación y el agotamiento de los linfocitos T efectores, y la potenciación de los fenotipos reguladores/antiinflamatorios en las células B, las células madre mesenquimales (MSC) y las células mieloides, como las células supresoras derivadas de los mieloides (MDSC) y la glía (Faustman y Davis 2010, Salomon 2021).

SÍNTESIS

35 La presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen a TNFR2, así

como usos de los anticuerpos y métodos asociados. La divulgación también proporciona procesos para fabricar, preparar y producir anticuerpos que se unen a TNFR2. Los anticuerpos de la divulgación son útiles en uno o más de los diagnósticos, profilaxis o tratamiento de trastornos o afecciones mediados o asociados con la actividad de TNFR2, incluyendo, pero sin limitarse a, la artritis reumatoide (RA), espondilitis anquilosante (AS), enfermedad de Chron (CD), colitis ulcerosa (UC), enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), trasplante, psoriasis (PSO), artritis psoriásica (PSA), dermatitis atópica (AD), vitiligo, alopecia areata (AA), diabetes de tipo 1 (T1D), esclerosis múltiple (MS), enfermedad del intestino irritable (IBD), hepatitis autoinmune y lupus eritematoso sistémico (SLE). La divulgación abarca además la expresión de anticuerpos, y la preparación y fabricación de composiciones que comprenden anticuerpos de la divulgación, tales como medicamentos para el uso de los anticuerpos.

Se proporcionan polinucleótidos que codifican anticuerpos que se unen a TNFR2. También se proporcionan polinucleótidos que codifican cadenas pesadas o cadenas ligeras de anticuerpos, o ambas. Se proporcionan células huésped que expresan los anticuerpos. Se proporcionan métodos de tratamiento que utilizan los anticuerpos. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los métodos de tratamiento o métodos de prevención de enfermedades asociadas con o mediadas por la expresión de TNFR2 y o TNFR2 vinculante artritis reumatoide (RA), espondilitis anquilosante (AS), enfermedad de Chron (CD), colitis ulcerosa (UC), enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), trasplante, psoriasis (PSO), artritis psoriásica (PSA), dermatitis atópica (AD), vitiligo, alopecia areata (AA), diabetes tipo 1 (T1D), esclerosis múltiple (MS), enfermedad del intestino irritable (IBD), hepatitis autoinmune y lupus eritematoso sistémico (SLE)].

La presente invención puede entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada de las formas de realización de la invención y los Ejemplos incluidos en la presente. Debe entenderse que esta invención no se limita a métodos específicos de fabricación que, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología empleada en la presente tiene por objeto describir únicamente formas de realización específicas y no pretende ser limitativa.

Las formas de realización de ejemplo (E) de la invención proporcionada en la presente incluyen:

E1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a TNFR2, que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), que comprende las secuencias CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de una secuencia VH

seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30; y las secuencias CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de una secuencia VL seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.

5 E2. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a TNFR2, que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), que comprende las secuencias CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de acuerdo con SEQ ID NO: 30, y las secuencias CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de acuerdo con SEQ ID NO: 9.

10 E3. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a TNFR2, que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), que comprende

(i) una secuencia CDR-L1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una secuencia CDR-L2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, y una secuencia CDR-L3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, y una secuencia CDR-H1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 10; una
15 secuencia CDR-H2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 20; una secuencia CDR-H3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 12; o

(ii) una secuencia CDR-L1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una secuencia CDR-L2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, y una secuencia CDR-L3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, y una secuencia CDR-H1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 10; una
20 secuencia CDR-H2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 11; una secuencia CDR-H3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 12.

E4. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a TNFR2, que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), en donde una secuencia CDR-L1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una secuencia CDR-L2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, y una secuencia CDR-L3 de acuerdo con la SEQ
25 ID NO: 3, y en donde una secuencia CDR-H1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 10; una secuencia CDR-H2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 20; una secuencia CDR-H3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 12.

E5. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E1-E4, que comprende una
30 secuencia marco VH derivada de una secuencia VH de línea germinal humana seleccionada del grupo que consiste en IGHV1-46, IGHV4-31, IGHV4-30-4 e IGHV4-4.

E6. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E1-E5, que comprende una secuencia marco VH derivada de una secuencia de línea germinal IGHV1-46 humana.

E7. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E1-E6, que comprende una
35 secuencia marco VL derivada de una secuencia VL de línea germinal humana

seleccionada del grupo que consiste en IGKV1-9, IGKV1-33, IGKV1-27, IGKV1-39, IGKV1-9, IGKV1-1 e IGKV1-11.

E8. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E1-E7, que comprende una secuencia marco VL derivada de una secuencia IGKV1-9 de línea germinal humana.

- 5 E9. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E1-E8, que comprende una secuencia marco VL y una secuencia marco VH en donde una o ambas de la secuencia marco VL y la secuencia marco VH es al menos el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de línea germinal humana de la que se derivó.

- 10 E10. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E1-E9, que comprende una secuencia marco VL y una secuencia marco VH, y en donde una o ambas de la secuencia marco VL o la secuencia marco VH es idéntica a la secuencia de línea germinal humana de la que se derivó.

- 15 E11. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E1-E10, en donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 8, y en donde la VH comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 21.

- 20 E12. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E1-E11, que comprende la secuencia VH de SEQ ID NO: 13, y la VL de SEQ ID NO: 4.

- E13. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E1-E11, que comprende una secuencia VH al menos el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 21, y que comprende una secuencia VL al menos el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la
25 SEQ ID NO: 8.

E14. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E13, que comprende la secuencia VH de SEQ ID NO: 21, y la VL de SEQ ID NO: 8.

E15. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E14, que comprende una secuencia VH codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 32.

- 30 E16. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E14, que comprende una secuencia VH codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 33.

E17. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E1-E16, que comprende una secuencia VL codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 31.

- 35 E18. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E1-E17, que comprende una o ambas de una secuencia VH codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que

tiene el número de acceso ATCC PTA-127528 y una secuencia VH codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA-127529.

E19. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E1-E18, que comprende una secuencia VL codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA-127531.

E20. Un anticuerpo que comprende una o ambas de una secuencia VH codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA-127528 y una secuencia VH codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA-127529; y una secuencia VL codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA-127531.

E25. El anticuerpo de acuerdo con E1-E24, que comprende además un dominio pesado constante (CH1) y un dominio ligero constante (CL).

E26. El anticuerpo de acuerdo con E25, en donde el CH1 se conecta con la VH, y el CL se conecta con la VL formando un dominio Fab.

E26. El anticuerpo de acuerdo con E25, que comprende un primer y un segundo dominio Fab.

E27. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E25-E26, que comprende un dominio Fc de anticuerpo que comprende una primera cadena Fc y una segunda cadena Fc.

E28. El anticuerpo de acuerdo con E27, en donde el primer dominio Fab se fusiona covalentemente a la primera cadena Fc, y el segundo dominio Fab se fusiona covalentemente a la segunda cadena Fc.

E29. El anticuerpo de acuerdo con E27-E28, en donde el C-terminal del dominio CH1 en el primer dominio Fab se fusiona covalentemente al N-terminal de la primera cadena Fc, y el C-terminal del dominio CH1 en el segundo dominio Fab se fusiona covalentemente al N-terminal de la segunda cadena Fc.

E30. El anticuerpo de acuerdo con E31, en donde el dominio Fc es el dominio Fc de una IgA (por ejemplo IgA₁ o IgA₂), IgD, IgE, IgM o IgG (por ejemplo IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄).

E31. El anticuerpo de acuerdo con E30, en donde el dominio Fc es el dominio Fc de una IgG₁.

E32. El anticuerpo de acuerdo con E31, en donde el dominio CH1 en el primer dominio Fab comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 23.

E33. El anticuerpo de acuerdo con E31-E32, en donde el CL en el primer dominio Fab comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 5.

E34. El anticuerpo de acuerdo con E31-E33, en donde el anticuerpo comprende una

cadena ligera (LC) que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 9.

E35. El anticuerpo de acuerdo con E31-E34, en donde el primer dominio Fab y el segundo dominio Fab son idénticos.

5 E36. El anticuerpo de acuerdo con E31-E35, en donde la primera cadena Fc comprende, de N-terminal a C-terminal: una primera región de bisagra, una primera región CH2, y una primera región CH3, y la segunda cadena Fc comprende, de N-terminal a C-terminal: una segunda región de bisagra, una segunda región CH2, y una segunda región CH3.

10 E37. El anticuerpo de acuerdo con E36, en donde una o ambas de la primera región de bisagra y la segunda región de bisagra comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 23.

E38. El anticuerpo de acuerdo con E36-E37, en donde uno o ambos del primer dominio CH2 y el segundo dominio CH2 comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 25.

15 E39. El anticuerpo de acuerdo con E36-E38, en donde uno o ambos del primer dominio CH3 y segundo dominio CH3 comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 26.

20 E40. El anticuerpo de acuerdo con E36-E39, en donde una o ambas de la primera cadena Fc y segunda cadena Fc comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 37.

E41. El anticuerpo de acuerdo con E36-E40, en donde la primera cadena Fc y la segunda cadena Fc son idénticas.

E42. El anticuerpo de acuerdo con E32-E41, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 22.

25 E43. El anticuerpo de acuerdo con E26-E42, que comprende además un tercer Fab y un cuarto Fab.

30 E44. El anticuerpo de acuerdo con E43, en donde el primer Fab, el segundo Fab, el tercer Fab, y el cuarto Fab comprenden cada uno una secuencia CDR-L1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una secuencia CDR-L2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, y una secuencia CDR-L3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, y una secuencia CDR-H1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 10; una secuencia CDR-H2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 20; una secuencia CDR-H3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 12.

35 E45. El anticuerpo de acuerdo con E43-E44, en donde el primer Fab, el segundo Fab, el tercer Fab, y el cuarto Fab comprenden cada uno una VH con una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 21 y una VL con una secuencia de acuerdo con la SEQ ID

NO: 8.

E46. El anticuerpo de acuerdo con E43-E45, en donde el primer Fab, el segundo Fab, el tercer Fab, y el cuarto Fab son idénticos entre sí.

5 E47. El anticuerpo de acuerdo con E43-E46, en donde la N' terminal del primer Fab se conecta con la C' terminal del tercer Fab.

E48. El anticuerpo de acuerdo con E43-E47, en donde la N' terminal del primer Fab se conecta con la C' terminal del tercer Fab a través de un primer ligador.

E49. El anticuerpo de acuerdo con E48, en donde el primer ligador comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 27.

10 E50. El anticuerpo de acuerdo con E43-E49, en donde la N' terminal del segundo Fab se conecta con la C' terminal del cuarto Fab.

E51. El anticuerpo de acuerdo con E43-E50, en donde la N' terminal del segundo Fab se conecta con la C' terminal del cuarto Fab a través de un segundo ligador.

15 E52. El anticuerpo de acuerdo con E51, en donde el segundo ligador comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 27.

E53. El anticuerpo de acuerdo con E47-E48, en donde la HC comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 30.

20 E54. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a TNFR2, que comprende una cadena pesada (HC) que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 30, y una cadena ligera (LC), que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 9.

E55. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E1-E54, que comprende una secuencia VH codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 33.

25 E56. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E1-E55, que comprende una secuencia VL codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 31.

E57. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a TNFR2, que comprende una secuencia de cadena pesada (HC) codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 33, y una secuencia de cadena ligera (LC) codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 31.

30 E58. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E1-E57, que comprende una secuencia HC codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA-127530.

35 E59. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E1-E58, que comprende una secuencia LC codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA127532.

- E60. Un anticuerpo que comprende una secuencia HC codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA-127530 y una secuencia LC codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA-127532.
- 5 E61. El anticuerpo de acuerdo con E30, en donde el dominio Fc es el dominio Fc de una IgG₂.
- E62. El anticuerpo de acuerdo con E61, en donde el dominio CH1 en el primer dominio Fab comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 14.
- E63. El anticuerpo de acuerdo con E61-E62, en donde la CL en el primer dominio Fab
10 comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 5.
- E64. El anticuerpo de acuerdo con E61-E63, en donde el primer dominio Fab y el segundo dominio Fab son idénticos.
- E65. El anticuerpo de acuerdo con E61-E64, en donde la primera cadena Fc comprende, de N-terminal a C-terminal: una primera región de bisagra, una primera
15 región CH2, y una primera región CH3, y la segunda cadena Fc comprende, de N-terminal a C-terminal: una segunda región de bisagra, una segunda región CH2, y una segunda región CH3.
- E66. El anticuerpo de acuerdo con E65, en donde una o ambas de la primera región de bisagra y la segunda región de bisagra comprenden una secuencia de acuerdo con
20 la SEQ ID NO: 15.
- E67. El anticuerpo de acuerdo con E65-E66, en donde uno o ambos del primer dominio CH2 y el segundo dominio CH2 comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 16.
- E68. El anticuerpo de acuerdo con E65-E67, en donde uno o ambos del primer
25 dominio CH3 y el segundo dominio CH3 comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 17.
- E69. El anticuerpo de acuerdo con E65-E68, en donde una o ambas de la primera cadena Fc y la segunda cadena Fc comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 18.
- 30 E70. El anticuerpo de acuerdo con E65-E69, en donde la primera cadena Fc y la segunda cadena Fc son idénticas.
- E71. El anticuerpo de acuerdo con E75-E70, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 19.
- E72. El anticuerpo de acuerdo con E65-E71, en donde el anticuerpo comprende una
35 cadena ligera (LC) que comprende una secuencia de acuerdo con una secuencia

seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, y SEQ ID NO: 9.

E73. El anticuerpo de acuerdo con E65-E72, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera (LC) que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 9.

5 E74. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a TNFR2, que comprende una cadena pesada (HC) que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 19, y una cadena ligera (LC) que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 9.

10 E75. El anticuerpo de acuerdo con E1-E74, en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC₅₀ inferior a 5 µM en un ensayo de potencia de TNFR2 humano en células reporteras Jurkat.

E76. El anticuerpo de acuerdo con E1-E75, en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC₅₀ inferior a 2 µM en un ensayo de potencia de TNFR2 humano en células reporteras Jurkat.

15 E77. El anticuerpo de acuerdo con E1-E76, en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC₅₀ inferior a 10 µM en un ensayo de potencia de TNFR2 humano en monocitos de sangre periférica humana.

E78. El anticuerpo de acuerdo con E1-E77, en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC₅₀ inferior a 5 µM en un ensayo de potencia de TNFR2 humano en monocitos de sangre periférica humana.

20 E79. El anticuerpo de acuerdo con E1-E78, en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC₅₀ inferior a 2 µM en un ensayo de potencia de TNFR2 humano en monocitos de sangre periférica humana.

25 E80. El anticuerpo de acuerdo con E1-E79, en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC₅₀ inferior a 20 µM en un ensayo de potencia de TNFR2 de cynomolgus en monocitos de sangre periférica de cynomolgus.

E81. El anticuerpo de acuerdo con E1-E80, en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC₅₀ inferior a 15 µM en un ensayo de potencia de TNFR2 de cynomolgus en monocitos de sangre periférica de cynomolgus.

30 E82. El anticuerpo de acuerdo con E1-E81, en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC₅₀ inferior a 5 µM en un ensayo de potencia de TNFR2 humano en células reporteras Jurkat.

E83. El anticuerpo de acuerdo con E1-E82, en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC₅₀ inferior a 1 µM en un ensayo de potencia de TNFR2 humano en células reporteras Jurkat.

35 E84. El anticuerpo de acuerdo con E1-E83, en donde el anticuerpo se caracteriza por

una EC₅₀ inferior a 0,5 µM en un ensayo de potencia de TNFR2 humano en células reporteras Jurkat.

5 E85. El anticuerpo de acuerdo con E1-E84, en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC₅₀ inferior a 2 mg/ml para la regulación hacia arriba de ICAM-1 en la población de linfocitos T primarias que expresan TNFR2 humano a partir de monocitos de sangre periférica humana.

10 E86. El anticuerpo de acuerdo con E1-E85, en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC₅₀ inferior a 15 mg/ml para la regulación hacia arriba de ICAM-1 en la población de linfocitos T primarias que expresan TNFR2 de cynomolgus a partir de monocitos de sangre periférica de cynomolgus.

E87. El anticuerpo de acuerdo con E1-E86, en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC₅₀ inferior a 1 mg/ml para la regulación hacia arriba de ICAM-1 en la población de linfocitos T primarias que expresan TNFR2 humano a partir de monocitos de sangre periférica humana.

15 E88. El anticuerpo de acuerdo con E1-E87, en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC₅₀ inferior a 0,2 mg/ml para la regulación hacia arriba de ICAM-1 en la población de linfocitos T primarias que expresan TNFR2 humano a partir de monocitos de sangre periférica humana.

20 E89. El anticuerpo de acuerdo con E1-E88, en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC₅₀ inferior a 10 mg/ml para la regulación hacia arriba de ICAM-1 en la población de linfocitos T primarias que expresan TNFR2 de cynomolgus a partir de monocitos de sangre periférica de cynomolgus.

E90. El anticuerpo de acuerdo con E1-E89, en donde el anticuerpo se caracteriza por una afinidad KD por TNFR2 humano inferior a 1 nm.

25 E91. El anticuerpo de acuerdo con E1-E90, en donde el anticuerpo se caracteriza por una afinidad KD por TNFR2 humano inferior a 0,5 nm.

E92. El anticuerpo de acuerdo con E1-E91, en donde el anticuerpo se caracteriza por una afinidad KD por TNFR2 humano inferior a 0,1 nm.

30 E93. El anticuerpo de acuerdo con E1-E92, en donde el anticuerpo se caracteriza por una afinidad KD por TNFR2 humano inferior a 0,07 nm.

E94. El anticuerpo de acuerdo con E1-E93, en donde el anticuerpo se caracteriza por una afinidad KD por TNFR2 de cynomolgus inferior a 1 nm.

E95. El anticuerpo de acuerdo con E1-E94, en donde el anticuerpo se caracteriza por una afinidad KD por TNFR2 de cynomolgus inferior a 0,1 nm.

35 E96. Un anticuerpo aislado que comprende la VH y la VL de un anticuerpo

seleccionado de la Tabla 35.

E97. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E1-99, para su uso como medicamento.

E98. El anticuerpo de acuerdo con E97, en donde el uso es para el tratamiento de uno o más seleccionados del grupo que consiste en artritis reumatoide (RA), espondilitis anquilosante (AS), enfermedad de Chron (CD), colitis ulcerosa (UC), enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), trasplante, psoriasis (PSO), artritis psoriásica (PSA), dermatitis atópica (AD), vitiligo, alopecia areata (AA), diabetes tipo 1 (T1D), esclerosis múltiple (MS), enfermedad del intestino irritable (IBD), hepatitis autoinmune y lupus eritematoso sistémico (SLE).

E99. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E96-E98, en donde el uso es para la artritis reumatoide (RA).

E100. Un polinucleótido aislado, que comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E1-E99.

E101. El polinucleótido de acuerdo con E100, en donde dicho polinucleótido es ARN.

E102. El polinucleótido de acuerdo con E100-E101, en donde dicho polinucleótido comprende al menos una modificación química.

E103. El polinucleótido de acuerdo con E102, en donde la modificación química en donde se selecciona de pseudouridina, 1-metilpseudouridina, N1-metilpseudouridina, N1-etilpseudouridina, 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitosina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 4-tio-pseudouridina, 5-aza-uridina, dihidropseudouridina, 5-metiluridina, 5-metoxiuridina y 2'-O-metiluridina.

E104. El polinucleótido de acuerdo con E100-E101, en donde dicho polinucleótido no comprende una modificación química.

E105. Un polinucleótido aislado que codifica una HC y una LC, o ambas, de un anticuerpo que se une a TNFR2, en donde dicho ácido nucleico comprende una o más seleccionadas del grupo que consiste en la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 31, la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 32, la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 33.

E106. Un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo aislado que se une específicamente a TNFR2, que comprende una secuencia de cadena pesada (HC) codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 33, y una secuencia

de cadena ligera (LC) codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 31.

5 E107. Un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo aislado que comprende una secuencia HC codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA-127530 y una secuencia LC codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA-127532.

E108. Un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con E100-E107.

E109. Una célula huésped aislada que comprende el polinucleótido de acuerdo con E100-E107, o el vector de acuerdo con E108.

10 E110. Un método para producir un anticuerpo aislado, que comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con E109 en condiciones que den lugar a la producción del anticuerpo, y recuperar el anticuerpo.

E111. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de acuerdo con E1-E99 y un portador farmacéuticamente aceptable.

E112. Un método para tratar una afección médica, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de E1-E99, el polinucleótido de acuerdo con E101, o la composición farmacéutica de acuerdo con E111.

20 E113. El método de acuerdo con E112, en donde la afección se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide (RA), espondilitis anquilosante (AS), enfermedad de Chron (CD), colitis ulcerosa (UC), enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), trasplante, psoriasis (PSO), artritis psoriásica (PSA), dermatitis atópica (AD), vitiligo, alopecia areata (AA), diabetes tipo 1 (T1D), esclerosis múltiple (MS), enfermedad del
25 intestino irritable (IBD), hepatitis autoinmune y lupus eritematoso sistémico (SLE).

E114. El método de acuerdo con cualquiera de E112-E113, que comprende administrar dicho anticuerpo o composición farmacéutica, por vía subcutánea.

E115. El método de acuerdo con cualquiera de E112-E114 en donde dicho anticuerpo de este, o composición farmacéutica, se administra alrededor de dos veces por semana,
30 una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas, una vez cada ocho semanas, una vez cada nueve semanas, una vez cada diez semanas, dos veces al mes, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses o una vez cada cuatro meses.

FIGURAS

Figura 1: Perfil SEC analítico del clon MR2-1 disponible en el mercado y del clon 162 purificado en un paso.

Figura 2: Representación de la estructura de un TetraFab, mostrando el dominio Fab extra etiquetado VH externo-CH1 externo) añadido sobre el VH interno (etiquetado VH interno-CH1 interno). Los VH externo e interno están ligados por un dominio G4S.

Figura 3 Curva de supervivencia de TetraFab-2053 frente a Ig de control. Estadística: Prueba de rangos logarítmicos (Mantel-Cox). Los datos también se muestran en la Tabla 21.

Figura 4: Variación porcentual del peso corporal frente al valor inicial. Los datos también se muestran en la Tabla 22.

Figura 5: IFN γ humano medio en plasma (pg/ml). *** $p < 0,001$ TF2053 frente a Ig de control. Los datos también se muestran en la Tabla 23.

Figura 6: IL10 humana media en plasma (pg/ml). *** $p < 0,001$ TF2053 frente a Ig de control. Los datos también se muestran en la Tabla 24.

Figura 7: IL17A humana plasmática media (pg/ml). ** $p < 0,01$ TF2053 frente a Ig de control. *** $p < 0,001$ TF2053 frente a Ig de control. Los datos también se muestran en la Tabla 25.

Figura 8: TNF α humano medio en plasma (pg/ml). *** $p < 0,001$ TF2053 frente a Ig de control. Estadística: prueba t de Student no apareada de 2 colas. Los datos también se muestran en la Figura Tabla 26.

Figura 9: Peso medio del hígado por peso corporal en el momento del sacrificio (mg/kg). *** $p < 0,001$ TF2053 frente a Ig de control. Los datos también se muestran en la Tabla 27.

Figura 10: Peso medio del bazo por peso corporal en el momento del sacrificio (mg/kg). *** $p < 0,001$ TF2053 frente a Ig de control. Estadística: prueba t de Student no apareada de 2 colas. Los datos también se muestran en la Tabla 28.

Figura 11: Porcentaje medio de linfocitos CD45+ humanos en leucocitos de sangre total. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$. **** $p < 0,0001$. Los datos también se muestran en la Tabla 29.

Figura 12: Porcentaje medio de linfocitos CD4+ humanos de CD45+/CD3+ humanos en sangre total. **** $p < 0,0001$. Los datos también se muestran en la Tabla 30.

Figura 13: Porcentaje medio de CD8+ humanos de linfocitos CD45+/CD3+ humanos de sangre total. **** $p < 0,0001$. Los datos también se muestran en la Tabla 31.

Figura 14: Porcentaje medio de células anérgicas (PD1+KLRG1-CD57-) de linfocitos

sanguíneos CD8+/CD3+/CD45+ humanos. **** $p < 0,0001$. Los datos también se muestran en la Tabla 32.

Figura 15: Porcentaje medio de células agotadas (PD1+KLRG1+CD57-) de linfocitos sanguíneos CD8+/CD3+/CD45+ humanos. ** $p < 0,01$. Los datos también se muestran en la Tabla 33.

Figura 16: Porcentaje medio de células senescentes (PD1-KLRG1+CD57+) de linfocitos sanguíneos CD8+/CD3+/CD45+ humanos. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. **** $p < 0,0001$. Estadística: prueba T no apareada de 2 colas entre grupos en cada punto temporal. Los datos también se muestran en la Tabla 34.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los encabezamientos de sección utilizados en la presente tienen únicamente fines organizativos y no deben interpretarse como limitativos del objeto descrito.

Todas las referencias citadas en la presente, incluyendo solicitudes de patentes, publicaciones de patentes, números de acceso UniProtKB se incorporan en la presente por referencia, como si cada referencia individual se indicara específica e individualmente para ser incorporada por referencia en su totalidad.

Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados en la presente son generalmente bien comprendidos y comúnmente empleados utilizando la metodología convencional por los expertos en la técnica, como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)); 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 Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al, eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan

et al, eds., 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 and 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 and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y sus versiones actualizadas.

Definiciones

10 A menos que se definan de otro modo en la presente, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tienen el significado comúnmente entendido por los expertos en la técnica.

Como se utilizan en la presente, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencias plurales a menos que se indique lo contrario. Por ejemplo, “un”
15 anticuerpo incluye uno o más anticuerpos.

Cuando se describen aspectos o formas de realización de la invención en términos de un grupo Markush u otra agrupación de alternativas, la presente invención abarca no solo todo el grupo enumerado en su conjunto, sino cada miembro del grupo individualmente y todos los posibles subgrupos del grupo principal, pero también el
20 grupo principal ausente de uno o más de los miembros del grupo. La presente invención también contempla la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo en la invención reivindicada.

Los ejemplos que siguen a los términos “p. ej.” o “por ejemplo” no pretenden ser exhaustivos ni limitativos.

25 Como se utiliza en la presente, el término “aproximadamente” cuando se utiliza para modificar un parámetro definido numéricamente (por ejemplo, la dosis de ***) significa que el parámetro puede variar hasta un 10 % por debajo o por encima del valor numérico establecido para dicho parámetro. Por ejemplo, una dosis de aproximadamente 5 mg significa $5\% \pm 10\%$, es decir, puede variar entre 4,5 mg y 5,5
30 mg.

Anticuerpo

Un “anticuerpo” se refiere a una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, como un polipéptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido, etc., a través de al menos un sitio de unión a antígeno, localizado en la región variable
35 de la molécula de inmunoglobulina. Como se utiliza en la presente, el término

“anticuerpo” puede abarcar cualquier tipo de anticuerpo (por ejemplo, monoespecífico, biespecífico), e incluye porciones de anticuerpos intactos que conservan la capacidad de unirse a un antígeno dado (por ejemplo, un “fragmento de unión a antígeno”), y cualquier otra configuración modificada de una molécula de inmunoglobulina que
5 comprenda un sitio de unión a antígeno.

Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, como IgG, IgA o IgM (o subclase de estos), y no es necesario que el anticuerpo sea de una clase en particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la región constante de sus cadenas pesadas (HC), las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases.
10 Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden dividirse a su vez en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Las regiones constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones
15 tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Entre los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos y configuraciones modificadas se incluyen (i) un fragmento Fab (un fragmento monovalente formado por los dominios VL, VH, CL y CH1); (ii) un fragmento F(ab')₂ (un fragmento bivalente formado por dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región de bisagra); y (iii) un fragmento Fv formado por los dominios VL y VH de un
20 único brazo de un anticuerpo. Además, aunque los dos dominios de un fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que permite fabricarlos como una única cadena proteica en donde las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv)); véanse, por ejemplo, Bird et al., Science 1988; 242:423-426 y Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1988 USA 85:5879-5883. También se incluyen otras formas de anticuerpos de cadena simple, como los diacuerpos.
25

Además, se incluyen los anticuerpos a los que les falta un residuo de aminoácido lisina (K) C-terminal en un polipéptido de cadena pesada (por ejemplo, la cadena pesada IgG1 humana comprende una lisina terminal). Como es conocido en la técnica, la lisina C-terminal a veces se recorta durante la producción del anticuerpo, dando como resultado un anticuerpo con una cadena pesada que carece de la lisina C-terminal. Alternativamente, puede producirse una cadena pesada de anticuerpo utilizando un
35 ácido nucleico que no incluya una lisina C-terminal.

Región variable

Una “región variable” de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, solas o combinadas. Como se sabe en la técnica, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera constan cada una de cuatro regiones marco (FR) conectadas por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables, y contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Si se desean variantes de una región variable del sujeto, en particular con sustitución en residuos de aminoácidos fuera de una región CDR (es decir, en la región marco), la sustitución de aminoácidos apropiada, preferentemente, la sustitución de aminoácidos conservadora, puede identificarse comparando la región variable del sujeto con las regiones variables de otros anticuerpos que contienen secuencias CDR1 y CDR2 de la misma clase canónica que la región variable del sujeto (Chothia y Lesk, J Mol Biol 196(4): 901-917, 1987).

En determinadas formas de realización, la delineación definitiva de una CDR y la identificación de los residuos que comprenden el sitio de unión de un anticuerpo se logra resolviendo la estructura del anticuerpo o resolviendo la estructura del complejo anticuerpo-ligando. En determinadas formas de realización, esto puede lograrse mediante cualquiera de las diversas técnicas conocidas por los expertos en la técnica, como la cristalografía de rayos X. En determinadas formas de realización, pueden emplearse diversos métodos de análisis para identificar o aproximar las regiones CDR. En determinadas formas de realización, pueden emplearse diversos métodos de análisis para identificar o aproximar las regiones CDR. Ejemplos de tales métodos incluyen, pero sin limitación, la definición de Kabat, la definición de Chothia, la definición de AbM, la definición de contacto, la definición extendida y la definición conformacional.

La definición de Kabat es una norma para numerar los residuos en un anticuerpo y se utiliza normalmente para identificar regiones CDR. Véase, por ejemplo, Johnson & Wu, 2000, Nucleic Acids Res., 28: 214-8. La definición de Chothia es similar a la definición de Kabat, pero la definición de Chothia tiene en cuenta las posiciones de determinadas regiones de bucle estructural. Véase, por ejemplo, Chothia et al., 1986, J. Mol. Biol., 196: 901-17; Chothia et al., 1989, Nature, 342: 877-83. La definición ampliada es la combinación de las definiciones de Kabat y Chothia. La definición AbM utiliza un conjunto integrado de programas informáticos producidos por Oxford Molecular Group que modelan la estructura de los anticuerpos. 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, Reino Unido; Oxford Molecular, Ltd., Reino Unido. La definición AbM modela la estructura terciaria de un anticuerpo a partir de la secuencia primaria utilizando una combinación de bases de datos de conocimiento y métodos ab initio, como los descritos por Samudrala et al., 1999, “Ab Initio Protein
 5 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. Véase, por ejemplo, MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol., 5:732-45. En otro enfoque, denominado en la presente “definición conformacional” de las CDR, las posiciones de las CDR pueden
 10 identificarse como los residuos que realizan contribuciones entálpicas a la unión al antígeno. Véase, por ejemplo, Makabe et al., 2008, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166. Otras definiciones de límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los enfoques anteriores, pero sin embargo se solaparán con al menos una parte de las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse a la luz de predicciones o
 15 hallazgos experimentales de que residuos o grupos de residuos particulares no afectan significativamente a la unión a antígeno. Como se utiliza en la presente, una CDR puede referirse a CDR definidas mediante cualquier enfoque conocido en la técnica, incluidas combinaciones de enfoques. Los métodos utilizados en la presente pueden utilizar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos enfoques. Para cualquier forma de
 20 realización dada que contenga más de una CDR, las CDR pueden definirse de acuerdo con una o más de las definiciones de Kabat, Chothia, extendida, AbM, de contacto o conformacional.

Región constante

Una “región constante” de un anticuerpo se refiere a la región constante de la
 25 cadena ligera del anticuerpo o a la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola o combinada. La región constante de una cadena pesada de IgG contiene tres dominios de inmunoglobulina secuenciales (CH1, CH2 y CH3), con una región de bisagra entre los dominios CH1 y CH2. Una región constante de cadena ligera IgG contiene un único dominio de inmunoglobulina (CL).

Dominio Fc y Cadena Fc

Un “dominio Fc” se refiere a la porción de una molécula de inmunoglobulina (Ig) que se correlaciona con un fragmento cristizable obtenido por digestión con papaína de una molécula de Ig. Como se utiliza en la presente, el término se refiere a la región
 30 constante de 2 cadenas de un anticuerpo, cada cadena excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante. Dentro de un dominio Fc, hay dos “cadenas

Fc" (por ejemplo, una "primera cadena Fc" y una "segunda cadena Fc"). "Cadena Fc" se refiere generalmente a la porción C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo. Así, la cadena Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante (CH2 y CH3) de las cadenas pesadas IgA, IgD e IgG, y a los tres últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de las cadenas pesadas IgE e IgM, y

5 opcionalmente a la bisagra flexible N-terminal a estos dominios.

Aunque los límites de la cadena Fc pueden variar, se suele definir que la cadena Fc de la cadena pesada de IgG humana comprende los residuos C226 o P230 hasta su carboxilo-terminal, en donde la numeración es según el índice EU de Edelman et al.,

10 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1969; 63(1):78-85 y como se describe en Kabat et al., 1991. Típicamente, la cadena Fc comprende desde aproximadamente el residuo aminoácido 236 hasta aproximadamente el 447 de la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana. "Cadena Fc" puede referirse a este polipéptido aislado o en el contexto de una molécula mayor (por ejemplo, en una cadena pesada de anticuerpos o una proteína de

15 fusión Fc).

Un dominio Fc "funcional" se refiere a un dominio Fc que posee al menos una función efectora de un dominio Fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" de ejemplo incluyen la unión a C1q; la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); la unión al receptor Fc; la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos

20 (ADCC); la fagocitosis; la regulación a la baja de receptores de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B); y la activación de células B, etc. Tales funciones efectoras generalmente requieren que el dominio Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, una región variable del anticuerpo) y pueden evaluarse utilizando diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar tales funciones efectoras del

25 anticuerpo.

Una cadena Fc de "secuencia nativa" se refiere a una cadena Fc que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una cadena Fc encontrada en la naturaleza. Una cadena Fc "variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una cadena Fc de secuencia nativa en virtud de al

30 menos una modificación de aminoácidos.

Anticuerpo monoclonal

Un "anticuerpo monoclonal" (mAb) se refiere a un anticuerpo derivado de una sola copia o clon, incluyendo, por ejemplo, cualquier clon eucariota, procariota o fago. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, ya que se dirigen contra un

35 único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos

policlonales, que suelen incluir diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante del antígeno. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por un método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizarán de acuerdo con la presente invención pueden fabricarse por el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, 1975, Nature 256:495 o pueden fabricarse por métodos de ADN recombinante como los descritos en la patente de EE.UU. N.º 4.816.567. En otro ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden aislarse a partir de bibliotecas de fagos como las generadas mediante las técnicas descritas en McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554.

Anticuerpo humano

Un “anticuerpo humano” se refiere a un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o que se ha fabricado utilizando cualquier técnica para fabricar anticuerpos totalmente humanos. Por ejemplo, los anticuerpos totalmente humanos pueden obtenerse utilizando ratones disponibles en el mercado que han sido diseñados para expresar proteínas inmunoglobulinas humanas específicas o mediante el despliegue de bibliotecas (por ejemplo, de fagos, levaduras o ribosomas) para preparar anticuerpos totalmente humanos. Esta definición de anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que contenga residuos de unión a antígenos no humanos.

Anticuerpo quimérico

Un “anticuerpo quimérico” se refiere a un anticuerpo en donde las secuencias de la región variable derivan de una especie y las secuencias de la región constante derivan de otra especie, como un anticuerpo en donde las secuencias de la región variable derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante derivan de un anticuerpo humano.

Anticuerpo humanizado

Un anticuerpo “humanizado” se refiere a un anticuerpo no humano (por ejemplo, murino) que es un anticuerpo quimérico que contiene una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Preferentemente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en donde los residuos de una CDR del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) 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 CDR importadas o secuencias marco, pero que se incluyen para refinar y optimizar aún más el rendimiento del anticuerpo.

Antígeno

5 Un “antígeno” se refiere a la entidad molecular utilizada para la inmunización de un vertebrado inmunocompetente para producir el anticuerpo que reconoce el antígeno o para cribar una biblioteca de expresión (por ejemplo, biblioteca de fagos, levaduras o ribosomas, entre otros) para la selección de anticuerpos. En la presente, el antígeno se denomina de forma más amplia y generalmente se pretende que incluya moléculas
10 diana que son reconocidas específicamente por el anticuerpo, incluyendo así fragmentos o imitaciones de la molécula utilizada en un proceso de inmunización para producir el anticuerpo o en el cribado de bibliotecas para seleccionar el anticuerpo.

Epítopo

 Un “epítopo” se refiere a la zona o región de un antígeno a la que se une
15 específicamente un anticuerpo, por ejemplo, una zona o región que comprende residuos que interactúan con el anticuerpo, según se determina por cualquier método bien conocido en la técnica. Existen muchos métodos conocidos en la técnica para mapear y caracterizar la localización de epítomos en proteínas, incluyendo la resolución de la estructura cristalina de un complejo anticuerpo-antígeno, ensayos de competición,
20 ensayos de expresión de fragmentos de genes, mapeo de epítomos y ensayos basados en 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. Adicional o alternativamente, durante el proceso de descubrimiento, la generación y caracterización de anticuerpos puede dilucidar
25 información sobre epítomos deseables. A partir de esta información, es posible cribar competitivamente los anticuerpos para que se unan al mismo epítopo.

 Además, el epítopo al que se une un anticuerpo puede determinarse en un cribado sistemático utilizando péptidos superpuestos derivados del antígeno y determinando la unión por el anticuerpo. De acuerdo con los ensayos de expresión de
30 fragmentos de genes, el marco de lectura abierto que codifica el antígeno puede fragmentarse al azar o mediante constructos genéticos específicos y se determina la reactividad de los fragmentos expresados del antígeno con el anticuerpo que se va a analizar. Los fragmentos del gen pueden, por ejemplo, producirse por PCR y luego transcribirse y traducirse en proteína in vitro, en presencia de aminoácidos radiactivos.
35 La unión del anticuerpo a los fragmentos de antígeno marcados radiactivamente se

determina entonces por inmunoprecipitación y electroforesis en gel.

También pueden identificarse determinados epítopos utilizando grandes bibliotecas de secuencias peptídicas aleatorias visualizadas en la superficie de partículas de fagos (bibliotecas de fagos) o levaduras (visualización de levaduras).

- 5 Alternativamente, puede comprobarse la unión de una biblioteca definida de fragmentos peptídicos superpuestos al anticuerpo de prueba en ensayos de unión simples. En un ejemplo adicional, puede realizarse la mutagénesis de un antígeno, experimentos de intercambio de dominios y mutagénesis de barrido de alanina para identificar residuos requeridos, suficientes o necesarios para la unión al epítipo.

- 10 En su nivel más detallado, el epítipo de la interacción entre el antígeno y el anticuerpo puede definirse mediante las coordenadas espaciales que definen los contactos atómicos presentes en la interacción antígeno-anticuerpo, así como información sobre sus contribuciones relativas a la termodinámica de unión. A un nivel menos detallado, el epítipo puede caracterizarse por las coordenadas espaciales que
15 definen los contactos atómicos entre el antígeno y el anticuerpo. A un nivel aún menos detallado, el epítipo puede caracterizarse por los residuos de aminoácidos que comprende, definidos por un criterio específico, por ejemplo, por la distancia entre átomos (por ejemplo, átomos pesados, es decir, átomos distintos del hidrógeno) en el anticuerpo y el antígeno. A un nivel aún menos detallado, el epítipo puede
20 caracterizarse a través de la función, por ejemplo, por la competencia de unión con otros anticuerpos. El epítipo también puede definirse de forma más genérica como aquel que comprende residuos de aminoácidos cuya sustitución por otro aminoácido alterará las características de la interacción entre el anticuerpo y el antígeno (por ejemplo, utilizando la exploración de alanina).

- 25 Del hecho de que las descripciones y definiciones de los epítopos, en función del método de cartografía de epítopos utilizado, se obtengan con diferentes niveles de detalle, se deduce que la comparación de epítopos para diferentes anticuerpos sobre el mismo antígeno puede realizarse de forma similar con diferentes niveles de detalle.

- Los epítopos descritos a nivel de aminoácidos, por ejemplo, determinados a
30 partir de una cristalografía de rayos X, espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (NMR), Espectrometría de Masas de intercambio hidrógeno/deuterio (H/D-MS), se dice que son idénticos si contienen el mismo conjunto de residuos de aminoácidos. Se dice que los epítopos se solapan si comparten al menos un aminoácido. Se dice que los epítopos están separados (son únicos) si no comparten ningún residuo de
35 aminoácido.

Incluso otro método que puede emplearse para caracterizar un anticuerpo es utilizar ensayos de competición con otros anticuerpos que se sabe que se unen al mismo antígeno, para determinar si un anticuerpo de interés se une al mismo epítopo que otros anticuerpos. Los ensayos de competición son bien conocidos por los expertos en la técnica. Se dice que los epítomos caracterizados por unión en competición se solapan si la unión de los anticuerpos correspondientes es mutuamente excluyente, es decir, la unión de un anticuerpo excluye la unión simultánea o consecutiva del otro anticuerpo. Se dice que los epítomos son separados (únicos) si el antígeno es capaz de acomodar la unión de los dos anticuerpos correspondientes simultáneamente.

Los epítomos pueden ser lineales o conformacionales. En un epítopo lineal, todos los puntos de interacción entre la proteína y la molécula que interactúa (como un anticuerpo) se producen linealmente a lo largo de la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína. Un “epítopo no lineal” o “epítopo conformacional” comprende polipéptidos (o aminoácidos) no contiguos dentro de la proteína antigénica a los que se une un anticuerpo específico del epítopo.

Afinidad de unión

El término “afinidad de unión” se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se utiliza en la presente, “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (K_D). La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la técnica. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse con facilidad, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápidamente y tienden a permanecer unidos durante más tiempo. En particular, el término “afinidad de unión” se refiere a la velocidad de disociación de una interacción antígeno-anticuerpo particular. La K_D es la relación entre la velocidad de disociación, también denominada “velocidad de desactivación (k_{off})” o “ k_d ”, y la velocidad de asociación o “velocidad de activación (k_{on})” o “ k_a ”. Así, K_D es igual a k_{off} / k_{on} (o k_d/k_a) y se expresa como concentración molar (M). Se deduce que cuanto menor sea la K_D , mayor será la afinidad de unión. Por lo tanto, una K_D de 1 μ M indica una afinidad de unión más débil en comparación con una K_D de 1 nM. Los valores de K_D para anticuerpos pueden determinarse utilizando métodos bien establecidos en la técnica. Un método de

ejemplo para determinar la K_D de un anticuerpo es mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), típicamente utilizando un sistema biosensor como el sistema BIACORE. El análisis cinético BIACORE comprende el análisis de la unión y disociación de un antígeno a partir de chips con moléculas inmovilizadas (por ejemplo, moléculas que comprenden dominios de unión a epítomos), en su superficie. Otro método para determinar la K_D de un anticuerpo es mediante interferometría de biocapa, utilizando normalmente la tecnología OCTET® (sistema Octet QK^e, ForteBio). Alternativamente o, además, también puede utilizarse un ensayo KinExA (Kinetic Exclusion Assay), disponible en Savidyne Instruments (Boise, ID).

10 **Anticuerpo monoespecífico**

Un “anticuerpo monoespecífico” se refiere a un anticuerpo que comprende uno o más sitios de unión a antígeno por molécula, de forma que todos y cada uno de los sitios de unión del anticuerpo reconocen específicamente el epítipo idéntico en el antígeno. Así, en los casos en que un anticuerpo monoespecífico tiene más de un sitio de unión a antígeno, los sitios de unión compiten entre sí por unirse a una molécula de antígeno.

Anticuerpo biespecífico

Un “anticuerpo biespecífico” se refiere a una molécula que tiene especificidad de unión para al menos dos epítomos diferentes. En algunas formas de realización, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse simultáneamente a dos antígenos diferentes. En otras formas de realización, los dos epítomos diferentes pueden residir en el mismo antígeno.

Tetrafab

Una molécula tetrafab se refiere a un anticuerpo o a una porción de unión a antígeno de este que comprende cuatro sitios de unión a antígeno. Los sitios de unión a antígeno pueden unirse a uno, dos, tres o cuatro epítomos diferentes, y dichos epítomos pueden estar en una, dos, tres o cuatro dianas diferentes.

Concentración efectiva semimáxima (EC_{50})

El término “concentración efectiva semimáxima (EC_{50})” se refiere a la concentración de un agente terapéutico que provoca una respuesta a medio camino entre el valor inicial y máximo después de un tiempo de exposición especificado. El agente terapéutico puede causar inhibición o estimulación. El valor de EC_{50} se suele utilizar, y se utiliza en la presente, como medida de potencia.

Agonista

Por “agonista” se entiende una sustancia que promueve (es decir, induce,

provoca, potencia o aumenta) la actividad o el efecto biológico de otra molécula. El término agonista abarca sustancias (como un anticuerpo) que se unen a una molécula para promover la actividad de esa molécula.

Antagonista

- 5 Un “antagonista” se refiere a una sustancia que impide, bloquea, inhibe, neutraliza o reduce una actividad o efecto biológico de otra molécula, como un receptor. El término antagonista engloba sustancias (como un anticuerpo) que se unen a una molécula para impedir o reducir la actividad de dicha molécula.

Competir

- 10 El término “competir”, como se utiliza en la presente con respecto a un anticuerpo, significa que un primer anticuerpo se une a un epítipo de una manera suficientemente similar a la unión de un segundo anticuerpo de tal manera que el resultado de la unión del segundo anticuerpo con su epítipo aún disminuye de forma detectable en presencia del primer anticuerpo en comparación con la unión del segundo
- 15 anticuerpo en ausencia del primer anticuerpo. La alternativa, en donde la unión del primer anticuerpo a su epítipo también disminuye de forma detectable en presencia del segundo anticuerpo, puede ser el caso, aunque no necesariamente. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítipo sin que ese segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su respectivo epítipo. Sin
- 20 embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de forma detectable la unión del otro anticuerpo con su epítipo o ligando aún, ya sea en igual, mayor o menor medida, se dice que los anticuerpos “compiten entre sí” por la unión de su(s) epítipo(s) respectivo(s). La presente invención abarca tanto los anticuerpos competidores como los de competencia cruzada. Independientemente del mecanismo por el que se
- 25 produzca dicha competencia o competencia cruzada (por ejemplo, impedimento estérico, cambio conformacional o unión a un epítipo común o parte de este), el experto en la técnica apreciaría, basándose en las enseñanzas proporcionadas en la presente, que dichos anticuerpos competidores o de competencia cruzada están incluidos y pueden ser útiles para los métodos descritos en la presente.

Receptor Fc

- 30 Un “receptor Fc” (FcR) se refiere a un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas formas de realización, un FcR es un FcR humano nativo. En algunas formas de realización, un FcR es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII,
- 35 incluyendo variantes alélicas y formas empalmadas alternativamente de esos

receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activador”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) en su dominio citoplasmático, (véase, por ejemplo, Daeron, Annu. Rev. Immunol. 1997; 15:203-234). Los FcR se revisan, por ejemplo, en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 1991; 9:457-92; Capel et al., Immunomethods 1994; 4:25-34; y de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 1995; 126:330-41. El término “receptor Fc” engloba a otros FcR, incluidos los que se identifiquen en el futuro. El término “receptor Fc” también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol. 1976; 117:587 y Kim et al., J. Immunol. 1994; 24:249) y la regulación de la homeostasis de las inmunoglobulinas. Se conocen métodos para medir la unión al FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie y Ward., Immunol. Today 1997; 18(12):592-598; Ghetie et al., Nature Biotechnology, 1997; 15(7):637- 640; Hinton et al., J. Biol. Chem. 2004; 279(8):6213-6216; WO 2004/92219).

Célula efectora

Una “célula efectora” es un leucocito que expresa uno o más FcR y desempeña funciones efectoras. En determinadas formas de realización, las células efectoras expresan al menos FcγRIII y realizan funciones efectoras ADCC. Ejemplos de leucocitos que median ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, macrófagos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo, de la sangre.

Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC)

El término “citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos” o “ADCC” hace referencia a una forma de citotoxicidad en donde la Ig secretada se une a los receptores Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, células NK, neutrófilos y macrófagos) para permitir que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora de antígeno y posteriormente eliminan la célula diana con citotoxinas. Las células NK, que son las principales mediadoras de la ADCC, solo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo ADCC *in vitro*, como el descrito en las patentes de

EE.UU. Nros. 5.500.362, 5.821.337 o 6.737.056. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen PBMC y células NK. Alternativa o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, p. ej., en un modelo animal como el descrito en Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 1998; 95:652-656. Se describen anticuerpos adicionales con secuencias de aminoácidos de región Fc alteradas y actividad ADCC aumentada o disminuida, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nros. 7.923.538 y 7.994.290.

Actividad de ADCC mejorada

El término “actividad de ADCC mejorada” se refiere a un anticuerpo que es más eficaz en la mediación de ADCC *in vitro* o *in vivo* en comparación con el anticuerpo original, en donde el anticuerpo y el anticuerpo original difieren en al menos un aspecto estructural, y cuando las cantidades de dicho anticuerpo y anticuerpo original utilizadas en el ensayo son esencialmente las mismas. En algunas formas de realización, el anticuerpo y el anticuerpo original tienen la misma secuencia de aminoácidos, pero el anticuerpo está afucosilado mientras que el anticuerpo original está fucosilado. En algunas formas de realización, la actividad de ADCC se determinará utilizando un ensayo ADCC *in vitro*, pero se contemplan otros ensayos o métodos para determinar la actividad de ADCC, por ejemplo, en un modelo animal, etc. En algunas formas de realización, un anticuerpo con actividad de ADCC mejorada tiene afinidad mejorada por FcγRIIIA.

Unión a FcR o actividad ADCC alterada

El término afinidad de unión a FcR o actividad ADCC “alterada” se refiere a un anticuerpo que tiene una actividad aumentada o disminuida para una o más de las actividades de unión a FcR o actividad ADCC en comparación con un anticuerpo progenitor, en donde el anticuerpo y el anticuerpo progenitor difieren en al menos un aspecto estructural. Un anticuerpo que “muestra una unión aumentada” a un FcR se une al menos a un FcR con mejor afinidad que el anticuerpo original. Un anticuerpo que “muestra disminución de la unión” a un FcR, se une al menos a un FcR con menor afinidad que el anticuerpo original. Tales anticuerpos que muestran unión disminuida a un FcR pueden poseer poca o ninguna unión apreciable a un FcR, por ejemplo, 0-20 por ciento de unión al FcR en comparación con una región Fc de secuencia nativa IgG.

Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

El término “citotoxicidad dependiente del complemento” o “CDC” se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada), que están unidos a su

antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede utilizarse un ensayo CDC, por ejemplo, como el descrito en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 1996; 202: 163. Los anticuerpos con secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas y capacidad de unión a Clq aumentada o disminuida se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nros. 6.194.551, EE.UU. 7.923.538, EE.UU. 7.994.290 y WO 1999/51642.

Célula huésped

Por “célula huésped” se entiende una célula individual o un cultivo celular que puede ser o ha sido receptor de vector(es) para la incorporación de insertos polinucleotídicos. Las células huésped incluyen la progenie de una única célula huésped, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula madre original debido a una mutación natural, accidental o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas in vivo con un polinucleótido o polinucleótidos de esta invención.

Vector

Un “vector” se refiere a un constructo capaz de liberar y, preferentemente, expresar uno o más genes o secuencias de interés (por ejemplo, un gen codificador de anticuerpos) en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, pero sin limitación, plásmidos y vectores virales, y pueden incluir ácidos nucleicos desnudos o pueden incluir ácidos nucleicos asociados con materiales que ayudan a la liberación (por ejemplo, agentes condensadores catiónicos, liposomas, etc.). Los vectores pueden incluir ADN o ARN. Un “vector de expresión”, como se utiliza en la presente, se refiere a un vector que incluye al menos un gen que codifica un polipéptido, al menos un elemento regulador (por ejemplo, secuencia promotora, secuencia poli(A)) relacionado con la transcripción o traducción del gen. Típicamente, un vector utilizado en la presente contiene al menos un gen codificador de anticuerpos, así como uno o más elementos reguladores o marcadores seleccionables. Los componentes del vector pueden incluir, por ejemplo, uno o más de los siguientes: una secuencia señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos adecuados de control transcripcional (como promotores, potenciadores y terminadores). Para la traducción, también pueden incluirse uno o más elementos de control de la traducción, como sitios de unión a ribosomas, sitios de iniciación de la traducción y codones de parada.

Aislada

Una molécula “aislada” (por ejemplo, un anticuerpo) se refiere a una molécula que, en virtud de su origen o fuente de derivación (1) no está asociada con componentes

naturalmente asociados que la acompañan en su estado nativo, (2) está sustancialmente libre de otras moléculas de la misma fuente, por ejemplo, especie, célula de la que se expresa, biblioteca, etc., (3) es expresada por una célula de una especie diferente o (4) no se produce en la naturaleza. Así, una molécula sintetizada químicamente o expresada en un sistema celular diferente del sistema del que procede naturalmente, estará “aislada” de sus componentes asociados naturalmente. Una molécula también puede quedar sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente mediante aislamiento, utilizando técnicas de purificación bien conocidas en la técnica.

10 **Polipéptido / Proteína**

Un “polipéptido” o “proteína” (utilizados indistintamente en la presente) se refiere a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud. La cadena puede ser lineal o ramificada. La cadena puede comprender uno o más aminoácidos modificados. Los términos también abarcan una cadena de aminoácidos que ha sido modificada de forma natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, como la conjugación con un componente de etiquetado. También se incluyen en la definición, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que los polipéptidos pueden presentarse como cadenas simples o cadenas asociadas.

Polinucleótido / Ácido Nucleico

Un “polinucleótido” o “ácido nucleico” (utilizados indistintamente en la presente) se refiere a una cadena de nucleótidos de cualquier longitud, e incluye el ADN y el ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados o sus análogos o cualquier sustrato que pueda ser incorporado a una cadena por la ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación de la estructura nucleotídica puede realizarse antes o después del ensamblaje de la cadena. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse aún más después de la polimerización, por ejemplo, mediante la conjugación con un componente de etiquetado. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, “tapas”, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, modificaciones internucleotídicas como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo,

fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellas que contienen sustancias colgantes, como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), los que contienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), los que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), los que contienen alquiladores, los que tienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido o polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en los azúcares puede sustituirse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores estándar o activados para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o pueden conjugarse con soportes sólidos. Los OH terminales 5' y 3' pueden fosforilarse o sustituirse con aminas o grupos orgánicos de cobertura de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivarse a grupos protectores estándar.

Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares 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 azúcares carbocíclicos, azúcares alfa- o beta-anoméricos, azúcares epiméricos como la arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares piranosas, azúcares furanosas, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos abásicos de nucleósidos como el ribósido de metilo.

Sustitución conservadora

Una "sustitución conservadora" se refiere a la sustitución de un aminoácido por un residuo biológica, química o estructuralmente similar. Biológicamente similar significa que la sustitución no destruye una actividad biológica. Estructuralmente similar significa que los aminoácidos tienen cadenas laterales de longitud similar, como la alanina, la glicina y la serina o un tamaño similar. Por similitud química se entiende que los residuos tienen la misma carga o son hidrófilos o hidrófobos. Ejemplos particulares incluyen la sustitución de un residuo hidrofóbico, como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro o la sustitución de un residuo polar por otro, como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico o glutamina por asparagina, serina por treonina, y similares. Ejemplos particulares de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, la sustitución de un residuo polar por otro, como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico o glutamina por asparagina, y similares. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos suelen incluir, por ejemplo, sustituciones

dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina.

Identidad

5 El término “identidad” o “idéntico a” se refiere a la relación general entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN o moléculas de ARN) o entre moléculas polipeptídicas. “Identidad” mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre dos o más secuencias con alineaciones de huecos abordadas por un modelo matemático particular de programas
10 informáticos (por ejemplo, algoritmos), que son bien conocidos en la técnica.

Los términos “aumentar”, “mejorar”, “disminuir” o “reducir” se refieren a valores relativos a una medición de valor inicial, como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en la presente o una medición en un individuo o sujeto de control (o múltiples individuos o sujetos de control) en ausencia del tratamiento
15 descrito en la presente. En algunas formas de realización, un “individuo de control” es un individuo afectado por la misma forma de enfermedad o lesión que el individuo tratado. En algunas formas de realización, un “individuo de control” es un individuo que no está afectado por la misma forma de enfermedad o lesión que el individuo tratado.

Excipiente

20 El término “excipiente” se refiere a cualquier material que, combinado con un principio activo de interés (por ejemplo, un anticuerpo), permite que el principio activo conserve su actividad biológica. La elección del excipiente dependerá en gran medida de factores como el modo de administración, el efecto del excipiente sobre la solubilidad y la estabilidad, y la naturaleza de la forma farmacéutica. Como se utiliza en la presente, “excipiente” incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión,
25 recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, portadores, diluyentes y similares que sean fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de excipientes incluyen uno o más de los siguientes: agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de estos, y pueden incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico o polialcoholes como manitol o sorbitol
30 en la composición.

Tratamiento

Los términos “que tratar”, “tratar” o “tratamiento” se refieren a cualquier tipo de
35 tratamiento, por ejemplo, tal como para aliviar, paliar o ralentizar la progresión de la

enfermedad, trastorno o afección del paciente o cualquier daño tisular asociado a la enfermedad. En algunas formas de realización, la enfermedad, trastorno o afección es X.

Prevención

- 5 Los términos “prevenir” o “prevención” se refieren a uno o más de los retrasos en la aparición, la reducción de la frecuencia o la reducción de la gravedad de al menos un signo o síntoma (por ejemplo, ***específico para una aplicación concreta) de una enfermedad, trastorno o afección particular (por ejemplo, ***). En algunas formas de realización, la prevención se evalúa sobre una base poblacional, de modo que se
- 10 considera que un agente “previene” una enfermedad, trastorno o afección particular si se observa una disminución estadísticamente significativa en el desarrollo, frecuencia o intensidad de uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno o afección en una población susceptible a la enfermedad, trastorno o afección. La prevención puede considerarse completa cuando la aparición de la enfermedad, trastorno o afección se ha
- 15 retrasado durante un período de tiempo predefinido.

Sujeto

- Los términos “sujeto”, “individuo” o “paciente” (utilizados indistintamente en la presente) se refieren a cualquier animal, incluidos los mamíferos. Los mamíferos de acuerdo con la invención incluyen caninos, felinos, bovinos, caprinos, equinos, ovinos,
- 20 porcinos, roedores, lagomorfos, primates, humanos y similares, y abarcan mamíferos en el útero. En una forma de realización, los humanos son sujetos adecuados. Los sujetos humanos pueden ser de cualquier sexo y estar en cualquier fase de desarrollo. En algunas formas de realización, un sujeto es un paciente con enfermedad de artritis reumatoide (RA), espondilitis anquilosante (AS), enfermedad de Chron (CD), colitis
- 25 ulcerosa (UC), enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), trasplante, psoriasis (PSO), artritis psoriásica (PSA), dermatitis atópica (AD), vitiligo, alopecia areata (AA), diabetes tipo 1 (T1D), esclerosis múltiple (MS), enfermedad del intestino irritable (IBD), hepatitis autoinmune y lupus eritematoso sistémico (SLE).

Cantidad terapéuticamente eficaz

- 30 El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de principio activo que provoca la respuesta biológica o medicinal en un tejido, sistema, animal, individuo o ser humano que busca un investigador, veterinario, médico u otro clínico, que puede incluir uno o más de los siguientes:
- (1) prevenir la enfermedad; por ejemplo, prevenir una enfermedad, afección o trastorno
- 35 en un individuo que puede estar predispuesto a la enfermedad, afección o trastorno pero

que aún no experimenta o muestra la patología o sintomatología de la enfermedad;
 (2) inhibir la enfermedad; por ejemplo, inhibir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que experimenta o muestra la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, detener o ralentizar el desarrollo ulterior de la patología o sintomatología); y

(3) mejorar la enfermedad; por ejemplo, mejorar una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que experimenta o muestra la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, revertir la patología o sintomatología).

Anticuerpos contra TNFR2

La divulgación proporciona anticuerpos que se unen al TNFR2, también conocido como miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral 1B (TNFRSF1B), CD120b o p75. El TNFR2 es uno de los dos receptores de membrana que se unen al factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), siendo el otro el TNFR1. El TNFR2 es un receptor transmembrana de tipo I, con un dominio extracelular formado por 4 dominios ricos en cisteína CRD. La unión del TNF α al TNFR2 desencadena una cascada de señalización intracelular que conduce a la activación de NF-KB y, posteriormente, a la proliferación, activación y supervivencia celular.

Como se utiliza en la presente, el término “TNFR2” incluye variantes, isoformas, homólogos, ortólogos y parálogos de TNFR2. En algunas formas de realización, un anticuerpo descrito en la presente presenta reacciones cruzadas con TNFR2 de especies distintas de la humana, como TNFR2 de mono cynomolgus, así como diferentes formas de TNFR2. En algunas formas de realización, un anticuerpo puede ser completamente específico para TNFR2 humano y puede no mostrar reactividad cruzada con especies (por ejemplo, no se une a TNFR2 de ratón) u otros tipos de reactividad cruzada. Como se utiliza en la presente, TNFR2 se refiere al TNFR2 humano natural, a menos que el contexto indique lo contrario. Por lo tanto, un “anticuerpo TNFR2” “anticuerpo anti-TNFR2” u otra designación similar significa cualquier anticuerpo (como se define en la presente) que se une o reacciona con TNFR2, una isoforma, fragmento o derivado de este. La forma madura y de longitud completa de TNFR2, representada por el número de acceso UniProtKB/Swiss-Prot P20333 se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 34. La forma madura y de longitud completa de TNFR2 de ratón, representada por el número de acceso UniProtKB/Swiss-Prot P25119 se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 35. La forma madura y de longitud completa de TNFR2 de cynomolgus, representada por el número de acceso a la base de datos NCBI XP_005544817 se proporciona en la presente como SEQ ID

NO: 36.

En algunos aspectos, los anticuerpos de la divulgación agonizan TNFR2. En algunos aspectos, los anticuerpos de la divulgación no muestran la unión de TNF α a la molécula de TNFR2 unida por el anticuerpo.

5 En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-TNFR2 de la divulgación abarca un anticuerpo que uno o ambos de i) compite por la unión a TNFR2 humano con o ii) se une al mismo epítipo que, un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 21 y la
10 SEQ ID NO: 8.

Los anticuerpos anti-TNFR2 de la presente divulgación pueden abarcar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos
15 biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados, anticuerpos de cadena simple (ScFv), mutantes de estos, proteínas de fusión que comprenden un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de dominio), anticuerpos humanizados y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de
20 unión a antígeno de la especificidad requerida, incluidas las variantes de glicosilación de los anticuerpos, las variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos y los anticuerpos modificados covalentemente. Los anticuerpos pueden ser murinos, de rata, humanos o de cualquier otro origen (incluidos anticuerpos quiméricos o humanizados). En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-TNFR2 es un anticuerpo
25 monoclonal. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-TNFR2 es un anticuerpo humano o humanizado. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-TNFR2 es un anticuerpo quimérico.

En algunas formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo que tiene una secuencia de región variable de cadena ligera (VL) y una secuencia de región variable de cadena pesada (VH) como las que se encuentran en la Tabla del listado de secuencias o variantes de estas.

30 La invención también proporciona porciones CDR de anticuerpos contra TNFR2. La determinación de las regiones CDR está bien dentro de la habilidad de la técnica. Se entiende que, en algunas formas de realización, las CDR pueden ser una combinación de las CDR de Kabat y Chothia (también denominadas "CDR combinadas" o "CDR ampliadas"). En otro enfoque, denominado en la presente "definición conformacional"
35 de las CDR, las posiciones de las CDR pueden identificarse como los residuos que

realizan contribuciones entálpicas a la unión al 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 limitadas para mantener la estructura de bucle adecuada para que el anticuerpo se una a un antígeno específico. La determinación de las CDR conformacionales está bien dentro de la habilidad de la técnica. En algunas formas de realización, las CDR son las CDR de Kabat. En otras formas de realización, las CDR son las CDR de Chothia. En otras formas de realización, las CDR son las CDR extendidas, AbM, conformacionales o de contacto. En otras palabras, en las formas de realización con más de una CDR, las CDR pueden ser cualquiera de las CDR de Kabat, Chothia, extendidas, AbM, conformacionales, de contacto o combinaciones de estas.

En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende uno o ambos de i) la cadena pesada de longitud completa, con o sin la lisina C-terminal o ii) la cadena ligera de longitud completa del anticuerpo anti-TNFR2 TF-2053.

En determinadas formas de realización, un anticuerpo descrito en la presente comprende un dominio Fc. El dominio Fc puede derivarse de IgA (por ejemplo, IgA₁ o IgA₂), IgG, IgE o IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄). En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-TNFR2 es un anticuerpo IgG1.

La invención abarca modificaciones de las CDR y regiones variables que se muestran en la Tabla 5. Por ejemplo, la invención incluye anticuerpos que comprenden regiones variables y CDR funcionalmente equivalentes que no afectan significativamente a sus propiedades, así como variantes que han aumentado o disminuido la actividad o la afinidad. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos puede mutarse para obtener un anticuerpo con la afinidad de unión a TNFR2 deseada. La modificación de polipéptidos es una práctica rutinaria en la técnica y no es necesario describirla en detalle en la presente. Los ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos, una o más supresiones o adiciones de aminoácidos que no cambian significativamente de forma perjudicial la actividad funcional o que maduran (mejoran) la afinidad del polipéptido por su ligando o el uso de análogos químicos.

También puede realizarse una modificación o mutación en una región marco o región constante para aumentar la semivida de un anticuerpo proporcionado en la presente. Véase, por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 00/09560. También puede realizarse una mutación en una región marco o región constante para alterar la inmunogenicidad del anticuerpo, para proporcionar un sitio para la unión covalente o no

covalente a otra molécula o para alterar propiedades tales como la fijación del complemento, la unión al FcR y la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. En algunas formas de realización, no se realizan más de una a cinco sustituciones conservadoras de aminoácidos dentro de la región marco o la región constante. En otras formas de realización, no se realizan más de una a tres sustituciones conservadoras de aminoácidos dentro de la región marco o región constante. De acuerdo con la invención, un único anticuerpo puede tener mutaciones en una o más de las CDR o regiones marco del dominio variable o en la región constante.

En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante modificada que ha aumentado o disminuido la afinidad de unión a un receptor gamma Fc humano, es inmunológicamente inerte o parcialmente inerte, por ejemplo, no desencadena la lisis mediada por complemento, no estimula la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) o no activa la microglía; o tiene actividades reducidas (en comparación con el anticuerpo no modificado) en una o más de las siguientes: desencadenar la lisis mediada por complemento, estimular la ADCC o activar la microglía. Pueden utilizarse diferentes modificaciones de la región constante para conseguir un nivel o combinación óptimos de funciones efectoras. Véase, 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 formas de realización, la región constante se modifica como se describe en *Eur. J. Immunol.*, 1999, 29:2613-2624; Publicación PCT N.º WO99/058572.

Las modificaciones también incluyen polipéptidos glicosilados y no glicosilados, así como polipéptidos con otras modificaciones postraduccionales, como, por ejemplo, glicosilación con diferentes azúcares, acetilación y fosforilación. Los anticuerpos están glicosilados en posiciones conservadas de sus regiones constantes (Jefferis y Lund, 1997, *Chem. Immunol.* 65:111-128; Wright y Morrison, 1997, *TibTECH* 15:26-32). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan a la función de la proteína (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 glicoproteína, que puede afectar a la conformación y a la 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 determinada a ciertas moléculas basándose en estructuras de

reconocimiento específicas. También se ha observado que la glicosilación de los anticuerpos afecta a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, se ha informado de que los anticuerpos producidos por células CHO con expresión regulada por tetraciclina de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc bisecante, han mejorado la actividad ADCC (Umana et al., 1999, Nature Biotech. 17:176-180).

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a TNFR2, que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), que comprende las secuencias CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de una secuencia VH seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30; y las secuencias CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de una secuencia VL seleccionada del grupo formado por las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a TNFR2, que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), que comprende las secuencias CDR-H1, CDR-H2, y CDR-H3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 30, y las secuencias CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 9.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a TNFR2, que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), que comprende

- (i) una secuencia CDR-L1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una secuencia CDR-L2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, y una secuencia CDR-L3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, y una secuencia CDR-H1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 10; una secuencia CDR-H2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 20; una secuencia CDR-H3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 12; o
- (ii) una secuencia CDR-L1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una secuencia CDR-L2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, y una secuencia CDR-L3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, y una secuencia CDR-H1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 10; una secuencia CDR-H2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 11; una secuencia CDR-H3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 12.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a TNFR2, que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), en la que una secuencia CDR-L1 de

acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una secuencia CDR-L2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, y una secuencia CDR-L3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, y en donde una secuencia CDR-H1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 10; una secuencia CDR-H2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 20; una secuencia CDR-H3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 12.

5 La secuencia marco VH puede derivarse de una secuencia VH de línea germinal humana seleccionada del grupo formado por IGHV1-46, IGHV4-31, IGHV4-30-4 e IGHV4-4. En algunos aspectos, la secuencia marco VH puede derivarse de una secuencia IGHV1-46 de línea germinal humana.

10 La secuencia marco VL puede derivarse de una secuencia de VL de línea germinal humana seleccionada del grupo que consiste en IGKV1-9, IGKV1-33, IGKV1-27, IGKV1-39, IGKV1-9, IGKV1-1, e IGKV1-11. En algunos aspectos, la secuencia marco VL se deriva de una secuencia IGKV1-9 de línea germinal humana.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un anticuerpo como se describe que comprende una secuencia marco VL y una secuencia marco VH en donde una o
15 ambas de la secuencia marco VL y la secuencia marco VH es al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la secuencia de línea germinal humana de la que se derivó.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un anticuerpo como se describe que comprende una secuencia marco VL y una secuencia marco VH, y en donde una o
20 ambas de la secuencia marco VL o la secuencia marco VH es idéntica a la secuencia de línea germinal humana de la que se derivó.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un anticuerpo en donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos según una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 8, y en donde la VH comprende una
25 secuencia de aminoácidos según una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 21.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un anticuerpo que comprende la secuencia VH de SEQ ID NO: 13, y la VL de SEQ ID NO: 4.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un anticuerpo que comprende
30 una secuencia VH al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la SEQ ID NO: 21, y que comprende una secuencia VL al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la SEQ ID NO: 8.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un anticuerpo que comprende
35 la secuencia VH de la SEQ ID NO: 21, y la VL de la SEQ ID NO: 8.

En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 que contiene variaciones de las regiones variables mostradas en el listado de secuencias, las CDR mostradas en el listado de secuencias, en donde tales polipéptidos variantes comparten al menos 70 %, al menos 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 87 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en el listado de secuencias. Estas cantidades no pretenden ser limitativas y los incrementos entre los porcentajes mencionados se contemplan específicamente como parte de la divulgación.

En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 que comprende una secuencia VH codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 32. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 que comprende una secuencia VH codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 33. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 que comprende una secuencia VL codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 31.

En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 que comprende un dominio pesado constante (CH1) y un dominio ligero constante (CL). El CH1 puede estar conectado al VH, y el CL puede estar conectado al VL formando un dominio Fab. El anticuerpo puede comprender un primer y un segundo dominio Fab.

En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 que comprende un dominio Fc de anticuerpo que comprende una primera cadena Fc y una segunda cadena Fc. El primer dominio Fab puede estar fusionado covalentemente a la primera cadena Fc, y el segundo dominio Fab puede estar fusionado covalentemente a la segunda cadena Fc. El C-terminal del dominio CH1 en el primer dominio Fab puede estar fusionado covalentemente al N-terminal de la primera cadena Fc, y el C-terminal del dominio CH1 en el segundo dominio Fab puede estar fusionado covalentemente al N-terminal de la segunda cadena Fc. El dominio Fc puede ser el dominio Fc de una IgA (por ejemplo, IgA₁ o IgA₂), IgD, IgE, IgM o IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄). El dominio Fc puede ser el dominio Fc de una IgG₁.

En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 en donde el dominio CH1 en el primer dominio Fab comprende una secuencia

de acuerdo con la SEQ ID NO: 23.

En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 en donde el CL en el primer dominio Fab comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 5.

- 5 En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 que comprende una cadena ligera (LC) que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 9.

- En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 en donde el primer dominio Fab y el segundo dominio Fab son idénticos. La
10 primera cadena Fc puede comprender, de N-terminal a C-terminal: una primera región de bisagra, una primera región CH2, y una primera región CH3, y la segunda cadena Fc puede comprender, de N-terminal a C-terminal: una segunda región de bisagra, una segunda región CH2, y una segunda región CH3.

- En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-
15 TNFR2 en donde una o ambas de la primera región de bisagra y la segunda región de bisagra comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 23. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 en donde uno o ambos del primer dominio CH2 y el segundo dominio CH2 comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 25. En algunas formas de realización, la
20 divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 en donde uno o ambos del primer dominio CH3 y el segundo dominio CH3 comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 26. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 en donde uno o ambos de la primera cadena Fc y la segunda cadena Fc comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 37.

- 25 En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 en donde la primera cadena Fc y la segunda cadena Fc son idénticas. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 que comprende una cadena pesada (HC) que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 22.

- 30 En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 que comprende además un tercer Fab y un cuarto Fab.

- En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2, en donde el primer Fab, segundo Fab, tercer Fab, y cuarto Fab comprenden cada uno una secuencia CDR-L1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una secuencia CDR-
35 L2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, y una secuencia CDR-L3 de acuerdo con la SEQ

ID NO: 3, y una secuencia CDR-H1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 10; una secuencia CDR-H2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 20; una secuencia CDR-H3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 12.

5 En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 en donde el primer Fab, el segundo Fab, el tercer Fab y el cuarto Fab comprenden cada uno una VH con una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 21 y una VL con una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 8.

10 En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 en donde el primer Fab, el segundo Fab, el tercer Fab y el cuarto Fab son idénticos entre sí.

En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 en donde la N' terminal del primer Fab está conectado al C' terminal del tercer Fab.

15 En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 en donde el N' terminal del primer Fab está conectado al C' terminal del tercer Fab a través de un primer ligador.

En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 en donde el primer ligador comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 27.

20 En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 en donde el N' terminal del segundo Fab está conectado al C' terminal del cuarto Fab.

25 En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 en donde el N' terminal del segundo Fab está conectado al C' terminal del cuarto Fab a través de un segundo ligador.

En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 en donde el segundo ligador comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 27.

30 En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 en donde el HC comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 30.
E54. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a TNFR2, que comprende una cadena pesada (HC) que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 30, y una cadena ligera (LC), que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 9.

35 En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-

TNFR2 que comprende una secuencia VH codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 33. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 que comprende una secuencia VL codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 31. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 que comprende una secuencia de cadena pesada (HC) codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 33, y una secuencia de cadena ligera (LC) codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 31.

En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 que comprende una secuencia HC codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA-127530. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 que comprende una secuencia LC codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA127532. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TNFR2 que comprende una secuencia HC codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA-127530 y una secuencia LC codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA-127532.

En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde el anticuerpo de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en la ATCC que tiene el Número de acceso ATCC PTA-127530 y el anticuerpo de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en la ATCC que tiene el Número de acceso ATCC PTA-127532.

En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 en donde el dominio Fc es el dominio Fc de una IgG₂. En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 en donde el dominio CH1 del primer dominio Fab comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 14. En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 en donde el CL en primer dominio Fab comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 5.

En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 en donde el primer dominio Fab y el segundo dominio Fab son idénticos.

En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo

anti-TNFR2 en donde la primera cadena Fc comprende, de N-terminal a C-terminal: una primera región de bisagra, una primera región CH2, y una primera región CH3, y la segunda cadena Fc comprende, de N-terminal a C-terminal: una segunda región de bisagra, una segunda región CH2, y una segunda región CH3.

- 5 En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 en donde una o ambas de la primera región de bisagra y la segunda región de bisagra comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 15. En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 en donde uno o ambos del primer dominio CH2 y el segundo dominio CH2 comprenden
10 una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 16.

En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 en donde uno o ambos del primer dominio CH3 y el segundo dominio CH3, comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 17.

- 15 En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 en donde una o ambas de la primera cadena Fc y la segunda cadena Fc, comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 18.

- 20 En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 en donde la primera cadena Fc y la segunda cadena Fc son idénticas. En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 19. En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera (LC) que comprende una secuencia de acuerdo con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 9.

- 25 En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 aislado, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera (LC) que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 9.

- 30 En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo aislado que se une específicamente a TNFR2, que comprende una cadena pesada (HC) que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 19, y una cadena ligera (LC) que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 9.

- 35 La invención también abarca proteínas de fusión que comprenden uno o más componentes de los anticuerpos divulgados en la presente. En algunas formas de realización, puede fabricarse una proteína de fusión que comprenda la totalidad o una parte de un anticuerpo anti-TNFR2 de la invención ligado a otro polipéptido. En otra

forma de realización, solo los dominios variables del anticuerpo anti-TNFR2 están ligados al polipéptido. En otra forma de realización, el dominio VH de un anticuerpo anti-TNFR2 está ligado a un primer polipéptido, mientras que el dominio VL de un anticuerpo anti-TNFR2 está ligado a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido de tal manera que los dominios VH y VL pueden interactuar entre sí para formar un sitio de unión a antígeno. En otra forma de realización, el dominio VH está separado del dominio VL por un ligador de manera que los dominios VH y VL puedan interactuar entre sí. A continuación, el anticuerpo VH-ligador-VL se liga luego al polipéptido de interés. Además, se pueden crear anticuerpos de fusión en donde dos (o más) anticuerpos de cadena simple se ligan entre sí. Esto es útil si se quiere crear un anticuerpo divalente o polivalente en una sola cadena polipeptídica o si se quiere crear un anticuerpo biespecífico.

Actividad biológica de los anticuerpos anti-TNFR2

Además de unirse a un epítipo en TNFR2, un anticuerpo de la divulgación puede mediar una actividad biológica. Es decir, la divulgación incluye un anticuerpo aislado que se une específicamente a TNFR2 y media en al menos una actividad detectable seleccionada entre las siguientes:

- (i) se une específicamente a TNFR2 humano;
- (ii) se une específicamente a TNFR2 de mono cynomolgus;
- (iii) se estimula la actividad de TNFR2 (por ejemplo, humano cynomolgus); y/o
- (iv) se permite la activación de $\text{TNF}\alpha$ de TNFR2 mientras se une a TNFR2

En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 aislado en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC_{50} en un ensayo de potencia de TNFR2 humano en células reporteras Jurkat inferior a una cifra seleccionada del grupo que consiste en 5 μM y 2 μM .

En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 aislado en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC_{50} en un ensayo de potencia de TNFR2 humano en monocitos de sangre periférica humana de menos de una cifra seleccionada del grupo que consiste en 10 μM , 5 μM y 2 μM .

En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 aislado en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC_{50} en un ensayo de potencia de TNFR2 de cynomolgus en monocitos de sangre periférica de cynomolgus inferior a una cifra seleccionada del grupo que consiste en 20 μM y 15 μM .

En algunas formas de realización proporcionadas en la presente es un

anticuerpo anti-TNFR2 aislado en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC_{50} en un ensayo de potencia de TNFR2 humano en células reporteras Jurkat de menos de una cifra seleccionada del grupo que consiste en 5 μ M, 1 μ M y 0,5 μ M.

5 En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 aislado en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC_{50} para la regulación hacia arriba de ICAM-1 en la población de linfocitos T primarias que expresan TNFR2 humano a partir de monocitos de sangre periférica humana de menos de una cifra seleccionada del grupo que consiste en 10 mg/ml, 5 mg/ml y 2 mg/ml.

10 En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 aislado en donde el anticuerpo se caracteriza por una EC_{50} para la regulación hacia arriba de ICAM-1 en la población de linfocitos T primarias que expresan TNFR2 de cynomolgus de monocitos de sangre periférica de cynomolgus inferior a una cifra seleccionada del grupo que consiste en 50 mg/ml, 20 mg/ml y 15 mg/ml y 10 mg/ml.

15 En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 aislado en donde el anticuerpo se caracteriza por una afinidad KD por TNFR2 humano de menos de una cifra seleccionada del grupo que consiste en 1 nm, 0,5 nm, 0,1 nm y 0,07 nm.

20 En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un anticuerpo anti-TNFR2 aislado en donde el anticuerpo se caracteriza por una afinidad KD para TNFR2 de cynomolgus de menos de una cifra seleccionada del grupo que consiste en 1 nm y 0,1 nm.

25 En algunos aspectos, la afinidad se mide mediante Resonancia de Plasmón Superficial (SPR). En algunos aspectos, la SPR se midió utilizando un BIAcore. En algunos aspectos, la afinidad se midió mediante SPR en la que TNFR2 biotinilado se captura en una superficie de tira de estreptavidina durante 60 segundos a un caudal de 10 ml/min, y el anticuerpo se inyecta sobre el TNFR2 capturado a concentraciones que varían para una fase de asociación de 50 segundos a 80 ml/min, y la fase de disociación se inicia entonces con tampón HBS-EP+ corriente inyectado durante 600 segundos a 30 80 ml/min. En algunos aspectos, el anticuerpo se inyecta a una concentración que oscila entre 10 y 0,625 nM. En algunos aspectos, particularmente para formatos IgG estándar que comprenden dos dominios de unión a antígeno, el anticuerpo se inyecta a una concentración que oscila entre 10 y 1,25 nM. En algunos aspectos, particularmente para formatos tetrafab que comprenden cuatro dominios de unión a antígeno, el anticuerpo se inyecta a una concentración que oscila entre 5 y 1,25 nM. En algunos aspectos, los 35

datos SPR se analizan utilizando el Software de evaluación Biacore.

Polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-TNFR2 y métodos de fabricación

La divulgación también proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos de la invención, incluyendo porciones de anticuerpos y anticuerpos modificados descritos en la presente. La invención también proporciona un método para fabricar cualquiera de los anticuerpos y polinucleótidos descritos en la presente. Los polinucleótidos pueden fabricarse y las proteínas expresarse mediante procedimientos conocidos en la técnica.

Si se desea, un anticuerpo anti-TNFR2 (monoclonal o policlonal) de interés puede secuenciarse y la secuencia polinucleotídica puede clonarse en un vector para su expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en el vector en una célula huésped y la célula huésped puede entonces expandirse y congelarse para su uso futuro. La producción de anticuerpos monoclonales recombinantes en cultivo celular puede llevarse a cabo mediante la clonación de genes de anticuerpos de células B por medios conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Tiller et al., 2008, J. Immunol. Methods 329, 112; patente de EE.UU. N.º 7.314.622.

En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una o ambas regiones variables de la cadena pesada o de la cadena ligera de un anticuerpo anti-TNFR2 proporcionado en la presente. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés pueden mantenerse en un vector en una célula huésped y la célula huésped luego puede expandirse y congelarse para su uso futuro. Los vectores (incluidos los vectores de expresión) y las células huésped se describen con más detalle en la presente.

En algunas formas de realización, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de cualquiera de los siguientes anticuerpos anti-TNFR2 IgG2-854, IgG2-1765 e IgG1. En una forma de realización, la invención proporciona polinucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-TNFR2 TF-2053.

En algunas formas de realización, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos de cadena pesada de anticuerpos anti-TNFR2 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 30,

En algunas formas de realización, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos de cadena ligera de anticuerpo anti-TNFR2 que

comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 9.

En algunas formas de realización, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos VH de anticuerpo anti-TNFR2 que comprende una
5 secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 29.

En algunas formas de realización, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos VL de anticuerpo anti-TNFR2 que comprende una
10 secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 8.

La invención proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso PTA-127530 que codifica la cadena pesada del anticuerpo Tetrafab 2053. La invención también proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia de ácidos
15 nucleicos del inserto del plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso PTA-127532 que codifica la cadena ligera del anticuerpo Tetrafab-2053. Además, la invención proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADN del plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso PTA-127528, que codifica un dominio VH del anticuerpo
20 Tetrafab-2053. La invención proporciona además un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADN del plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso PTA-127529, que codifica el dominio VH del anticuerpo Tetrafab-2053. La invención además proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto del plásmido
25 depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso PTA-127531 que codifica el dominio VL del anticuerpo Tetrafab-2053.

Se apreciará por aquellos expertos en la técnica que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como se describe en la presente. Algunos de estos polinucleótidos tienen
30 una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, la presente invención contempla específicamente polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones. 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 están
35 alterados como resultado de una o más mutaciones, tales como delecciones, adiciones

o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y la proteína resultantes pueden, aunque no necesariamente, tener una estructura o función alterada. Los alelos pueden identificarse mediante técnicas estándar (como la hibridación, la amplificación o la comparación de secuencias en bases de datos).

- 5 En una forma de realización, los dominios VH y VL o HC o LC de longitud completa, están codificados por polinucleótidos separados. Alternativamente, tanto VH como VL o HC y LC, están codificados por un único polinucleótido.

Los polinucleótidos complementarios a cualquiera de estas secuencias también se incluyen en la presente divulgación. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de ARNHn, que contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN de manera unívoca, y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Las secuencias codificantes o no codificantes adicionales pueden estar presentes en un polinucleótido de la presente divulgación, aunque no es necesario, y un polinucleótido puede estar unido a otras moléculas o materiales de soporte, aunque no es necesario.

Los polinucleótidos de esta invención pueden obtenerse mediante síntesis química, métodos recombinantes o PCR. Los métodos de síntesis química de polinucleótidos son bien conocidos en la técnica y no es necesario describirlos en detalle en la presente. Un experto en la técnica puede utilizar las secuencias proporcionadas en la presente y un sintetizador de ADN comercial para producir la secuencia de ADN deseada.

Para preparar polinucleótidos utilizando métodos recombinantes, puede insertarse un polinucleótido que 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 expone más adelante. Los polinucleótidos pueden insertarse en las células huésped por cualquier medio conocido en la técnica. Las células se transforman introduciendo un polinucleótido exógeno por 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 (como un plásmido) o integrado en el genoma de la célula huésped.

Los vectores de clonación adecuados pueden construirse según técnicas estándar o pueden seleccionarse de entre un gran número de vectores de clonación disponibles en la técnica. Aunque el vector de clonación seleccionado puede variar en función de la célula huésped que se pretenda utilizar, los vectores de clonación útiles

tendrán generalmente una o más características como i) la capacidad de autorreplicarse, ii) una diana única para una endonucleasa de restricción particular o iii) pueden llevar genes para un marcador que pueda utilizarse en la selección de 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 como pSA3 y pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación están disponibles en proveedores comerciales como BioRad, Strategene e Invitrogen.

Se proporcionan además vectores de expresión. Los vectores de expresión son generalmente constructos polinucleotídicos replicables que contienen un polinucleótido según la invención. Está implícito que un vector de expresión debe ser replicable en las células huésped, ya sea como episomas o como parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen, pero sin limitación, plásmidos, vectores virales, incluidos adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, cósmidos y vectores de expresión divulgados en la Publicación PCT N.º WO 87/04462. Por lo general, los componentes del vector pueden incluir, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos adecuados de control transcripcional (como promotores, potenciadores y terminadores). Para la expresión (es decir, la traducción), también suelen ser necesarios uno o más elementos de control de la traducción, como sitios de unión a ribosomas, sitios de iniciación de la traducción y codones de parada.

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

La invención también proporciona células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente. Para aislar los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteína de interés, puede utilizarse cualquier célula huésped capaz de sobreexpresar ADN heterólogo. Ejemplos no limitantes de células huésped de mamífero incluyen, entre otras, las células COS, HeLa y CHO. Véase también la publicación PCT N.º WO 87/04462. Las células huésped no mamíferas adecuadas incluyen procariotas (como *E. coli* o *B. subtilis*) y levaduras (como *S. cerevisiae*, *S.*

pombe o *K. lactis*).

Además, puede utilizarse cualquier número de líneas celulares disponibles comercialmente y no comercialmente que expresen polipéptidos o proteínas de acuerdo con la presente invención. Un experto en la técnica apreciará que las diferentes líneas celulares pueden tener diferentes requisitos nutricionales o pueden requerir diferentes condiciones de cultivo para el crecimiento óptimo y la expresión de polipéptidos o proteínas, y será capaz de modificar las condiciones según sea necesario.

Composiciones farmacéuticas

En otra forma de realización, la invención comprende composiciones farmacéuticas.

Una "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de un anticuerpo de la invención y uno o excipiente.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones y polvos liofilizados. La forma depende del modo de administración previsto y de la aplicación terapéutica.

También pueden utilizarse otros excipientes y modos de administración conocidos en la técnica farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse mediante cualquiera de las técnicas farmacéuticas conocidas, como los procedimientos de formulación y administración eficaces. Las consideraciones anteriores en relación con las formulaciones eficaces y los procedimientos de administración son bien conocidas en la técnica y se describen en los libros de texto estándar. La formulación de fármacos se discute, por ejemplo, en Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1975; Liberman et al., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980; y Kibbe et al., Eds., Handbook of Pharmaceutical Excipients (3rd Ed.), American Pharmaceutical Association, Washington, 1999.

Los excipientes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, y pueden comprender tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales como cloruro sódico; antioxidantes como ácido ascórbico y metionina; conservantes (como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, como metil- o propilparabeno; catecol; resorcinol;

ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de unos 10 residuos); proteínas, como la seroalbúmina, la gelatina o las inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, como la polivinilpirrolidona; aminoácidos, como la glicina, la glutamina, la asparagina, la histidina, la arginina o la lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, como glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, como EDTA; azúcares, como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal, como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); aminoácidos, como glicina o tensioactivos no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

10

Métodos terapéuticos, de diagnóstico y de otro tipo

Los anticuerpos y los conjugados de anticuerpos de la presente invención son útiles en diversas aplicaciones que incluyen, pero no se limitan a, métodos de tratamiento terapéutico y métodos de tratamiento diagnóstico.

15

En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención pueden estimular la actividad del TNFR2 y pueden ser útiles en el tratamiento, prevención, supresión y mejora de enfermedad(es) artritis reumatoide (RA), espondilitis anquilosante (AS), enfermedad de Chron (CD), colitis ulcerosa (UC), enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), trasplante, psoriasis (PSO), artritis psoriásica (PSA), dermatitis atópica (AD), vitiligo, alopecia areata (AA), diabetes tipo 1 (T1D), esclerosis múltiple (MS), enfermedad del intestino irritable (IBD), hepatitis autoinmune y lupus eritematoso sistémico (SLE) o enfermedades, trastornos y afecciones por estimulación del TNFR2.

20

En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar uno o más seleccionados del grupo que consiste en artritis reumatoide (RA), espondilitis anquilosante (AS), enfermedad de Chron (CD), colitis ulcerosa (UC), enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), trasplante, psoriasis (PSO), artritis psoriásica (PSA), dermatitis atópica (AD), vitiligo, alopecia areata (AA), diabetes tipo 1 (T1D), esclerosis múltiple (MS), enfermedad del intestino irritable (IBD), hepatitis autoinmune y lupus eritematoso sistémico (SLE). En algunas formas de realización, el método de tratamiento de uno o más seleccionados del grupo que consiste en artritis reumatoide (RA), espondilitis anquilosante (AS), enfermedad de Chron (CD), colitis ulcerosa (UC), enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), trasplante, psoriasis (PSO), artritis psoriásica (PSA), dermatitis atópica (AD), vitiligo, alopecia areata (AA), diabetes tipo 1 (T1D), esclerosis múltiple (MS), enfermedad del intestino irritable (IBD), hepatitis autoinmune y lupus eritematoso sistémico (SLE) en un sujeto comprende administrar al

30

35

sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos contra TNFR2 descritos en la presente. En algunas formas de realización, se proporciona un método para reducir la inflamación y/o activar o expandir tipos de células inmunorreguladoras en un sujeto, que comprende

5 administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo proporcionado en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona además un anticuerpo o composición farmacéutica como se describe en la presente para su uso en el método descrito de tratamiento de artritis reumatoide (RA), espondilitis anquilosante (AS), enfermedad de

10 Chron (CD), colitis ulcerosa (UC), enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), trasplante, psoriasis (PSO), artritis psoriásica (PSA), dermatitis atópica (AD), vitiligo, alopecia areata (AA), diabetes tipo 1 (T1D), esclerosis múltiple (MS), enfermedad del intestino irritable (IBD), hepatitis autoinmune y lupus eritematoso sistémico (SLE) u otras afecciones autoinmunes e inflamatorias. La invención también proporciona el uso de un

15 anticuerpo como se describe en la presente en la fabricación de un medicamento para tratar uno o más seleccionados del grupo que consiste en artritis reumatoide (RA), espondilitis anquilosante (AS), enfermedad de Chron (CD), colitis ulcerosa (UC), enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), trasplante, psoriasis (PSO), artritis psoriásica (PSA), dermatitis atópica (AD), vitiligo, alopecia areata (AA), diabetes tipo 1

20 (T1D), esclerosis múltiple (MS), enfermedad del intestino irritable (IBD), hepatitis autoinmune y lupus eritematoso sistémico (SLE) u otras afecciones autoinmunes e inflamatorias.

En otro aspecto, se proporciona un método de uno o más de detectar, diagnosticar o monitorizar uno o más seleccionados del grupo que consiste en artritis

25 reumatoide (RA), espondilitis anquilosante (AS), enfermedad de Chron (CD), colitis ulcerosa (UC), enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), trasplante, psoriasis (PSO), artritis psoriásica (PSA), dermatitis atópica (AD), vitiligo, alopecia areata (AA), diabetes tipo 1 (T1D), esclerosis múltiple (MS), enfermedad del intestino irritable (IBD), hepatitis autoinmune y lupus eritematoso sistémico (SLE) u otras afecciones

30 autoinmunes e inflamatorias. Por ejemplo, los anticuerpos anti-TNFR2 descritos en la presente pueden marcarse con una fracción detectable, como un agente de formación de imágenes y una etiqueta de sustrato enzimático. Los anticuerpos descritos en la presente también pueden utilizarse para ensayos de diagnóstico *in vivo*, como la obtención de imágenes *in vivo* (por ejemplo, PET o SPECT) o un reactivo de tinción.

35 Con respecto a todos los métodos descritos en la presente, la referencia a

anticuerpos anti-TNFR2 también incluye composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-TNFR2 y uno o más agentes adicionales.

Administración y dosificación

5 Típicamente, un anticuerpo de la invención se administra en una cantidad eficaz para tratar una afección como la descrita en la presente. Los anticuerpos de la invención pueden administrarse como un anticuerpo per se o alternativamente, como una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo.

10 Los anticuerpos de la invención se administran por cualquier vía adecuada en forma de una composición farmacéutica adaptada a dicha vía, y en una dosis eficaz para el tratamiento previsto.

En algunas formas de realización, los anticuerpos pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo, directamente en el torrente sanguíneo, en el músculo o en un órgano interno. Los medios adecuados para la administración parenteral incluyen
15 intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intramuscular y subcutánea. Los dispositivos adecuados para la administración parenteral incluyen inyectores de aguja (incluidas las microagujas), inyectores sin aguja y técnicas de infusión.

En otra forma de realización, los compuestos de la invención también pueden
20 administrarse por vía tópica sobre la piel o las mucosas, es decir, por vía dérmica o transdérmica. En otra forma de realización, los compuestos de la invención también pueden administrarse por vía intranasal o por inhalación. En otra forma de realización, los compuestos de la invención pueden administrarse por vía rectal o vaginal. En otra forma de realización, los compuestos de la invención también pueden administrarse
25 directamente al ojo o al oído.

El régimen de dosificación para los anticuerpos de la invención o las composiciones que contienen dichos anticuerpos se basa en una variedad de factores, incluyendo el tipo, edad, peso, sexo y condición médica del sujeto; la gravedad de la condición; la vía de administración; y la actividad del anticuerpo particular empleado.
30 Por lo tanto, el régimen de dosificación puede variar ampliamente. En una forma de realización, la dosis diaria total de un anticuerpo de la invención es típicamente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg/kg (es decir, mg de anticuerpo de la invención por kg de peso corporal) para el tratamiento de las condiciones indicadas discutidas en la presente. En otra forma de realización, la dosis diaria total del anticuerpo
35 de la invención es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg, y en otra

forma de realización, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 30 mg/kg.

Coadministración

5 Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. La invención proporciona cualquiera de los usos, métodos o composiciones definidos en la presente en donde un anticuerpo de la invención se utiliza en combinación con uno o más agentes terapéuticos descritos en la presente.

10 La administración de dos o más agentes “en combinación” significa que todos los agentes se administran lo suficientemente cerca en el tiempo como para afectar al tratamiento del sujeto. Los dos o más agentes pueden administrarse simultánea o secuencialmente. Además, la administración simultánea puede llevarse a cabo mezclando los agentes antes de la administración o administrando los agentes en el mismo momento, pero como formas de dosificación separadas en el mismo o diferente
15 lugar de administración.

Kits

Otro aspecto de la invención proporciona kits que comprenden el anticuerpo de la invención o composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo. Un kit
20 puede incluir, además del anticuerpo de la invención o una composición farmacéutica de este, agentes de diagnósticos o terapéuticos. Un kit también puede incluir instrucciones para su uso en un método de diagnóstico o terapéutico. En algunas formas de realización, el kit incluye el anticuerpo o una composición farmacéutica de este y un agente de diagnóstico.

25 En otra forma de realización, la invención comprende kits que son adecuados para su uso en la forma de realización de los métodos de tratamiento descritos en la presente. En una forma de realización, el kit contiene una primera forma de dosificación que comprende uno o más de los anticuerpos de la invención en cantidades suficientes para llevar a cabo los métodos de la invención. En otra forma de realización, el kit
30 comprende uno o más anticuerpos de la invención en cantidades suficientes para llevar a cabo los métodos de la invención y al menos un primer recipiente para una primera dosificación y un segundo recipiente para una segunda dosificación.

Depósitos biológicos

35 Los materiales representativos de la presente invención se depositaron en la

American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EE.UU., el 3 de marzo de 2023.

Anticuerpo	Descripción	N.º de acceso a ATCC
2053_outerVH	Dominio VH externo de TF2053	PTA-127528
2053_InnerVH	Dominio VH interno de TF2053	PTA-127529
2053_FullVH	HC completo de TF2053	PTA-127530
2053_VL	VL de TF2053	PTA-127531
2053_FullVL	LC completo de TF2053	PTA-127532

Los depósitos se realizaron con arreglo a las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes y su Reglamento (Tratado de Budapest). Esto garantiza el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. El depósito será puesto a disposición por la ATCC en virtud de los términos del Tratado de Budapest, y sujeto a un acuerdo entre Pfizer Inc. y la ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricciones de la progenie del cultivo del depósito al público tras la emisión de la patente U. S. pertinente o tras la puesta a disposición del público de cualquier solicitud de patente U. S. o extranjera, lo que ocurra primero. o extranjera, lo que ocurra primero, y garantiza la disponibilidad de la progenie a quien el Comisionado de Patentes y Marcas de los EE.UU. determine que tiene derecho a ella de acuerdo con la Sección 122 del 35 U.S.C. y las normas del Comisionado en virtud de la misma (incluida la Sección 1.14 del 37 C.F.R. con especial referencia al 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales depositados muriera o se perdiera o destruyera cuando se cultivara en condiciones adecuadas; los materiales serán sustituidos rápidamente, previa notificación, por otro igual. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una licencia para practicar la invención en contravención de los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

25

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos de aspectos específicos para llevar a cabo la presente invención se ofrecen únicamente con fines ilustrativos, y no pretenden limitar en modo alguno el alcance de la presente invención.

La descripción anterior y los Ejemplos siguientes detallan determinadas formas de realización específicas de la divulgación y describen el mejor modo contemplado por

30

los inventores. Se apreciará, sin embargo, que no importa lo detallado que pueda aparecer lo anterior en el texto, la divulgación puede practicarse de muchas maneras y la divulgación debe interpretarse de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

- 5 Aunque las enseñanzas divulgadas se han descrito con referencia a diversas aplicaciones, métodos, kits y composiciones, se apreciará que pueden realizarse diversos cambios y modificaciones sin apartarse de las enseñanzas expuestas en la presente y de la divulgación reivindicada a continuación. Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor las enseñanzas divulgadas y no pretenden limitar el
- 10 alcance de las enseñanzas presentadas en la presente. Aunque las presentes enseñanzas se han descrito en términos de estas formas de realización de ejemplo, el artesano experto comprenderá fácilmente que son posibles numerosas variaciones y modificaciones de estas formas de realización de ejemplo sin experimentación indebida. Todas estas variaciones y modificaciones están dentro del alcance de las presentes
- 15 enseñanzas.

Abreviaturas

Significado

AUC	Área bajo la curva
CDR	Región determinante de la complementariedad
CH	Constante pesada
CHO	Ovario de hámster chino
CRD	Dominio rico en cisteína
Cyno	Mono cynomolgus
DAPI	
EC ₅₀	Mitad de la concentración efectiva máxima
F	Hembra
Fab	Fragmento de unión a antígeno
FBS	Suero fetal bovino
Fc	Fragmento cristizable
FW	Marco
G4S	Glicina-glicina-glicina-glicina-serina
GFP	Proteína verde fluorescente
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IKBa	Factor nuclear del potenciador del gen del polipéptido kappa ligero en células B inhibidor alfa
IL-2	Interleucina-2

IP	Intraperitoneal
IV	Intravenoso
M	Macho
MFI	Intensidad media de fluorescencia
NF-KB	Factor nuclear kappa B
OX40	Receptor OX40, también conocido como TNFRSF4 o CD134
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
Pen/Estrep	Penicilina/estreptomicina
PFA	Paraformaldehído
PMA	Acetato de forbol 12-miristato 13
SDR	Residuos determinantes de la especificidad
SEC	Columna de exclusión por tamaño
SPR	Resonancia de plasmón superficial
TIGIT	Inmunorreceptor de linfocitos T con inmunoglobulina y dominio ITIM
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFR2	Receptor-2 del factor de necrosis tumoral
Treg	Linfocitos T reguladores

EJEMPLO 1 Aislamiento de anticuerpos monoclonales de ratón que se unen al TNFR2 humano y del mono cynomolgus

Se inmunizó a ratones SJL con varias inyecciones IP de Enbrel (HuTNFR2-IgG1-Fc) con ribi como adyuvante. Se realizó un cribado a la unión de los sueros al TNFR2 humano y del mono cynomolgus (Cyno) sobreexpresado en la superficie de células CHO. Los ratones que mostraron una fuerte unión a las células CHO fueron eutanasiados y las células B aisladas se fusionaron con mielomas P3X mediante electrofusión.

Tras el cribado del sobrenadante de hibridoma, utilizando la unión TNFR2 CHO, se seleccionaron 14 clones y se reformatearon en HulG1 y HulG2 (véase el ejemplo 2). De estos 28 HulG1 y HulG2, tras el cribado confirmatorio en células CHO con sobreexpresión de TNFR2 humano y cyno (véase la Tabla 1), se seleccionaron 16 para su caracterización adicional (clones 813, 817, 836, 846, 851, 854, 1201, 1070, 1211, 1215, 1296, 1302 1304, 1310, 1327 y 1329), mostrando un rango de unión a TNFR2 humano y cyno.

IgG ₁ clon	Hu CHO EC ₅₀ (ng/ml)	Cy CHO EC ₅₀ (ng/ml)	IgG ₂ clon	Hu CHO EC ₅₀ (ng/ml)	Cy CHO EC ₅₀ (ng/ml)
813	7557	nd	842	2379	nd
807	147,1	144,4	836	50,9	162
817	89,9	105,3	846	135	233
822	96,91	nd	851	363,1	nd
825	69,8	nd	854	106,2	130
899	35,2	149	1334	85,70	210,4
957	unión intermedia	unión débil	1201	163,2	33
1070	356,0	748,1	1209	2644	18500
1072	nd	nd	1211	245,0	nd
1076	79,2	279,4	1215	216,3	271
1296	160,2	412,3	1321	4250	5537
1304	234,0	unión débil	1329	163,4	unión fuerte
1285	nd	nd	1310	151,4	nd
1302	154,6	257,4	1327	337,5	486

Nd: no determinado (algunos clones eran poco expresivos y la cantidad de material para probar era limitada).

Tabla 1: Valores EC₅₀ en células CHO TNFR2 humanas y cyno de los pares HulG1 y HulG2 de los clones seleccionados.

5

EJEMPLO 2 Clonación de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-TNFR2 de ratón

Las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos anti-TNFR2 se clonaron utilizando el sistema de síntesis de ADNc SMART® (Takara Bio Inc. de Shiga, Japón) seguido de amplificación por PCR. El ADNc se sintetizó a partir de 1 ug de ARN total aislado de aproximadamente 500.000 células de hibridoma utilizando el kit RNEasy (Qiagen) y un oligo de cambio de plantilla con transcriptasa inversa SuperscriptIV™ (Invitrogen). A continuación, el ADNc se amplificó por PCR utilizando un cebador que se une a la secuencia del oligo SMART® IIA y un cebador específico de la región constante de ratón (kappa de ratón para la cadena ligera e IgG de ratón para la cadena pesada) con Q5 Alto-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs). Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se clonaron en el vector de expresión de mamíferos pTT5 de ratón que contiene la región constante IgG2a de ratón y las regiones constantes kappa, respectivamente, utilizando el método de clonación por infusión Takara Bio) y se determinaron las secuencias de ácidos nucleicos.

A continuación, las regiones pesadas variables se clonaron en el vector de expresión pTT5 que contenía una región constante IgG₁ humana mutada para abolir la función efectora (Leu234Ala, Leu235Ala y Gly237Ala, numeración EU; patente de EE.UU. N.º 5.624.821) produciendo cadenas pesadas quiméricas. Las regiones ligeras variables se clonaron en el vector de expresión de mamíferos pTT5 que contiene la región kappa humana constante para producir cadenas ligeras quiméricas.

EJEMPLO 3 Algunos anticuerpos anti-TNFR2 agonizan el TNFR2 humano en el ensayo de células informadoras de células Jurkat NF-KB-GFP

Las células Jurkat NF-KB-GFP (System Biosciences, Palo Alto, CA) se transfectaron de forma estable mediante transducción con un vector lentiviral que contenía un inserto TNFR2 humano de longitud completa (pLVX-puro, Takara Bio US). Para el ensayo, se sembraron 100.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos, en medio RPMI1640 suplementado con un 10% de FBS, 1x piruvato sódico, 1x Glutamax y Pen/Estrep. A continuación, las células fueron incubadas durante la noche a 37°C con diluciones seriadas de anticuerpos anti-TNFR2. Al día siguiente, las células se prepararon para el análisis por citometría de flujo de la siguiente manera: tras centrifugarlas para eliminar el sobrenadante, las células se trataron con tripsina al 0,25% para romper los grumos. Por último, las células se centrifugaron de nuevo, se resuspendieron en 75 ml de tampón de flujo que contenía una dilución 1/1000 del reactivo DAPI y se analizaron en un citómetro de flujo para determinar la expresión de GFP.

La Tabla 2 resume los resultados del ensayo previo con células CHO TNFR2 y la potencia en el ensayo de células Jurkat. Elegimos 9 clones, todos IgG₂, para su posterior caracterización, basándonos en un rango de EC₅₀ en el ensayo Jurkat y en la diversidad de secuencias.

Clon	Isotipo	Hu CHO (ng/ml)	Cy CHO (ng/ml)	Jurkat (ng/ml)
813	IgG ₁	7557	nd	1122
836	IgG ₂	50,9	162	598
846	IgG ₂	135	233	142
817	IgG ₁	89,9	105,3	170,1
851	IgG ₂	363,1	nd	263
854	IgG ₂	106,2	130	711
1201	IgG ₂	163,2	33	11,6
1070	IgG ₁	356,0	748,1	112,9
1211	IgG ₂	245,0	nd	130
1215	IgG ₂	216,3	271	492
1296	IgG ₁	160,2	412,3	3169
1304	IgG ₁	234,0	pobre	no agonista
1329	IgG ₂	163,4	unión fuerte	60
1310	IgG ₂	151,4	nd	667
1302	IgG ₁	154,6	257,4	660,9
1327	IgG ₂	337,5	486	no agonista

Nd: no determinado (algunos clones eran poco expresivos y la cantidad de material para probar era limitada).

Tabla 2: EC₅₀ de unión a CHO y ensayo reportero Jurkat de una serie de clones seleccionados

EJEMPLO 4 Características biofísicas y agonismo en células primarias (ensayo de activación de PBMC humanas) de clones agonistas seleccionados

A continuación, se comprobó la capacidad de los 9 clones previamente seleccionados para inducir la regulación hacia arriba de ICAM-1 en PBMC CD3+CD4+TIGIT+ humanas (véase el método en el ejemplo 11). También se evaluaron algunas propiedades biofísicas como la responsabilidad de secuencia y la inespecificidad (AC-SINS y polirreactividad).

Clon	Responsabilidades de secuencias	AC-SINS	Polirreactividad	Agonismo en PBMC humano
836	Sitio de glicosilación ligado a N	Bajo	Bajo	Agonista intermedio
846	Sitios de oxidación	Bajo	Alto	Agonista intermedio
851	Sitios de isomerización y desamidación	Intermedio	Alto	Agonista débil
854	Sitio de oxidación y desamidación	Intermedio	Bajo	Agonista fuerte
1201	Sitios de oxidación	Bajo	Bajo	Agonista débil
1211	Sitios de isomerización y desamidación	Bajo	Alto	Agonista débil
1215	Cisteína libre en sitios de CDR de oxidación	Bajo	Alto	Agonista débil
1310	Sitio de oxidación	Intermedio	Bajo	Agonista medio
1329	Sitio de glicosilación ligado a N	Alto	Alto	No agonista

Tabla 3: responsabilidades de secuencia, niveles de inespecificidad y agonismo en células primarias humanas.

Como se ve en la Tabla 3, observamos un rango de agonismo en PBMC humanas, y decidimos seguir adelante con los clones que mostraban cierta potencia en células primarias (clones 836, 846, 854, 1201 y 1310) y con niveles de inespecificidad que podríamos gestionar mediante optimización posterior si fuera necesario.

EJEMPLO 6 Clasificación epitópica de anticuerpos anti-TNFR2

También se realizó un binning de epítomos utilizando levaduras que expresaban quimeras de dominios TNFR1/TNFR2 humanos. Las células de levadura se transfectaron de forma estable con varios constructos, en los que uno o dos CRD de TNFR2 se intercambiaron por el correspondiente CRD de TNFR1 humano. Del mismo modo, también se probaron los constructos inversos, en los que uno o dos CRD de

TNFR1 se intercambiaron por el correspondiente CRD de TNFR2. La pérdida o ganancia de unión, respectivamente, indicaba que el CRD concreto era necesario para la unión al TNFR2 y contenía el epítipo.

Como se observa en la Tabla 4, la mayoría de los clones se unen a CRD3-4, excepto el clon 836 (CRD1) y el clon 1310 (CRD1-3-4).

clon	epítipo
836	CRD1
846	CRD3-4
854	CRD3-4
1201	CRD-3-4
1310	CRD1-3-4
1329	CRD3-4

Tabla 4: La unión a la quimera TNFR1/TNFR2 humana expresada en levadura se evaluó para determinar el dominio de unión en TNFR2

10 **EJEMPLO 7 Humanización de anticuerpos Anti-TNFR2 de ratón**

Se eligió el clon 854 para su posterior humanización por ser el anticuerpo agonista más fuerte. La humanización del clon 854 se llevó a cabo injertando las regiones hipervariables murinas en varios marcos humanos.

Las regiones hipervariables de la cadena pesada se definieron utilizando la definición SDR (Residuos Determinantes de la Especificidad), mientras que las regiones hipervariables de la cadena ligera se definieron utilizando la definición CDR (Región Determinante de la Complementariedad).

	FW1	SDR1	FW2	SDR2	WF3	SDR3	FW4
Cadena pesada (SEQ ID NO: 13)	Residuos 1-25 de la SEQ ID NO: 13	GFSFPSSGV D (SEQ ID NO: 10)	Residuos 36-49 de la SEQ ID NO: 13	VTWGVGS THYNSAL KS (SEQ ID NO: 11)	Residuos 66-97 de la SEQ ID NO: 13	GEW DEGFVYW GQG (SEQ ID NO: 12)	Residuos 107-117 de la SEQ ID NO: 13
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	WF3	CDR3	FW4
Cadena ligera (SEQ ID NO: 4)	Residuos 1-23 de la SEQ ID NO: 4	KASQNVGTA VA (SEQ ID NO: 1)	Residuos 35-49 de la SEQ ID NO: 4	SASNRYT (SEQ ID NO: 2)	Residuos 57-88 de la SEQ ID NO: 4	QQYSSYP LT (SEQ ID NO: 3)	Residuos 97-107 de la SEQ ID NO: 4

Tabla 5: secuencia de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del clon 854.

20

La definición SDR se utiliza para el injerto, en lugar de la CDR, por lo que los aminoácidos murinos críticos para la unión y la afinidad se conservan durante el proceso

de humanización.

- Los marcos de cadena pesada humana elegidos para el injerto de los SDR de cadena pesada murina 854 fueron los siguientes: IGHV4-31*02, IGHV4-30-4*07, IGHV4-4*08 (las 3 familias de línea germinal más cercanas al clon 854), IGHV3-23*01, IGHV1-46*01, e IGHV3-7*01 (3 marcos humanos de uso común), junto con el gen IGHJ4*01-J. Los marcos de cadenas ligeras humanas elegidos para el injerto de las 854 CDR de cadenas ligeras murinas fueron los siguientes: IGKV3-11*01, IGKV1-9*01, IGKV1-33*01, IGKV1-27*01, IGKV1-39*01, e IGKV4-1*01, junto con el gen IGKJ4*01 J.

10 **Ejemplo 8 Unión a células CHO TNFR2 humanas por anticuerpos TNFR2 humanizados**

Se expresaron todas las combinaciones de cadenas pesadas y ligeras y se comprobó su unión a células CHO TNFR2 humanas:

VH	VK	Nombre	EC ₅₀ nM	% de señal máx de 854	AC-SINS
		GBT-TNFR2-854 (original)	1,131	100	
IGHV4-31	IGKV1-9	GBT-TNFR2-0854_Graft1	31,71	48	Moderado
IGHV4-31	IGKV1-33	GBT-TNFR2-0854_Graft2	43,77	34	Moderado
IGHV4-31	IGKV1-27	GBT-TNFR2-0854_Graft3	90,01	22	Moderado
IGHV4-31	IGKV1-39	GBT-TNFR2-0854_Graft4	38,23	31	Moderado
IGHV4-31	IGKV3-11	GBT-TNFR2-0854_Graft5	42,95	41	Bajo
IGHV4-31	IGKV4-1	GBT-TNFR2-0854_Graft6	65,38	27	Bajo
IGHV4-30-4	IGKV1-9	GBT-TNFR2-0854_Graft7	271,2	51	Moderado
IGHV4-30-4	IGKV1-33	GBT-TNFR2-0854_Graft8	87,91	29	Moderado
IGHV4-30-4	IGKV1-27	GBT-TNFR2-0854_Graft9	125,2	22	Moderado
IGHV4-30-4	IGKV1-39	GBT-TNFR2-0854_Graft10	53,69	33	Moderado
IGHV4-30-4	IGKV3-11	GBT-TNFR2-0854_Graft11	41,04	34	Bajo
IGHV4-30-4	IGKV4-1	GBT-TNFR2-0854_Graft12	50,96	27	Bajo
IGHV4-4	IGKV1-9	GBT-TNFR2-0854_Graft13	28,44	29	Moderado
IGHV4-4	IGKV1-33	GBT-TNFR2-0854_Graft14	120,6	24	Moderado
IGHV4-4	IGKV1-27	GBT-TNFR2-0854_Graft15	143,3	15	Moderado
IGHV4-4	IGKV1-39	GBT-TNFR2-0854_Graft16	42,91	34	Moderado
IGHV4-4	IGKV3-11	GBT-TNFR2-0854_Graft17	47,82	36	Bajo
IGHV4-4	IGKV4-1	GBT-TNFR2-0854_Graft18	59,48	28	Bajo
IGHV3-23	IGKV1-9	GBT-TNFR2-0854_Graft19	9,437	56	Bajo
IGHV3-23	IGKV1-33	GBT-TNFR2-0854_Graft20	13,75	52	Moderado
IGHV3-23	IGKV1-27	GBT-TNFR2-0854_Graft21	27,55	50	Bajo
IGHV3-23	IGKV1-39	GBT-TNFR2-0854_Graft22	17,99	58	Bajo
IGHV3-23	IGKV3-11	GBT-TNFR2-0854_Graft23	26,35	51	Bajo
IGHV3-23	IGKV4-1	GBT-TNFR2-0854_Graft24	27,99	47	Bajo
IGHV3-7	IGKV1-9	GBT-TNFR2-0854_Graft25	10,96	56	Bajo
IGHV3-7	IGKV1-33	GBT-TNFR2-0854_Graft26	15,58	45	Bajo
IGHV3-7	IGKV1-27	GBT-TNFR2-0854_Graft27	13,48	64	Bajo
IGHV3-7	IGKV1-39	GBT-TNFR2-0854_Graft28	19,52	62	Bajo

IGHV3-7	IGKV3-11	GBT-TNFR2-0854_Graft29	26,07	46	Bajo
IGHV3-7	IGKV4-1	GBT-TNFR2-0854_Graft30	15,92	55	Bajo
IGHV1-46	IGKV1-9	GBT-TNFR2-0854_Graft31	1,873	79	Alto
IGHV1-46	IGKV1-33	GBT-TNFR2-0854_Graft32	4,995	74	Alto
IGHV1-46	IGKV1-27	GBT-TNFR2-0854_Graft33	2,97	72	Alto
IGHV1-46	IGKV1-39	GBT-TNFR2-0854_Graft34	2,579	78	Alto
IGHV1-46	IGKV3-11	GBT-TNFR2-0854_Graft35	1,579	78	Alto
IGHV1-46	IGKV4-1	GBT-TNFR2-0854_Graft36	5,436	66	Moderado

Tabla 6: Datos de unión de injertos humanos - se purificaron combinaciones de cadenas pesadas y ligeras y se comprobó su unión a células TNFR2 CHO humanas. Los resultados se expresan como EC₅₀ y % de unión en comparación con la señal máxima del 854 original.

5

Tras el injerto en varios marcos humanos, se observó una pérdida significativa de unión, como se resume en la Tabla 6. Algunos clones, como los injertos 31, 33, 34 y 35, mostraron un valor EC₅₀ cercano a 854, pero la señal máxima fue significativamente inferior, y su puntuación AC-SINS fue alta. Todas las puntuaciones de polirreactividad

10 ADN/insulina fueron bajas (datos no mostrados).

EJEMPLO 9 introducción de retro-mutaciones para restaurar la unión a TNFR2

Para restaurar la unión a TNFR2 al nivel del clon 854 original, se introdujeron varias retro-mutaciones en un número seleccionado de construcciones injertadas de

15 cadenas pesadas:

FW	Mutaciones introducidas (numeración de Kabat)
VH1-46	A24V
VH1-46	M69I, R71K
VH1-46	A24V, M69I, R71K
VH1-46	A24V, M69I, R71K, T75K
VH1-46	A24V, M69I, R71K, T73N, T75K
VH1-46	A24V, Q61S, M69I, R71K
VH3-7	L78V
VH3-7	R71K, L78V
VH3-7	A24V, L78V
VH3-7	A24V, R71K
VH4-30	V71K
VH4-30	F78V
VH4-30	V71K, F78V
VH4-30	V71K, T73N, F78V
VH4-30	V71K, N76S, F78V
VH4-30	V71K, F78V, V89I
VH4-30	I37V, V71K, F78V

Tabla 7: retro-mutaciones introducidas en los marcos de la cadena pesada humana VH1-46, VH3-7 y VH4-30.

Cada cadena pesada se emparejó con la siguiente cadena ligera humanizada: VK4-1, VK3-11, VK1-39 y VK1-9 como se describe en el ejemplo 7, pero también con la misma cadena ligera humanizada en la que la CDR2-L2 es germinal.

5

EJEMPLO 10 Unión a TNFR2 humano por anticuerpos TNFR2 humanizados

Se expresaron y purificaron un total de 114 clones, y su unión a células CHO TNFR2 humanas se comparó con el clon original 854. Como se observa en la Tabla 8, la mayoría de los clones mostraron una EC₅₀ cercana o mejor que la del clon original 854. Los clones 1847, 1765, 1753 y 1747 fueron seleccionados para su caracterización posterior.

10

Nombres de clones	Cadena pesada	Cadena ligera	CHO nM	EC₅₀	AC-SINS
Original 854			1,131		
1848	VH4-30_I37V_V71K_F78V	VK1-9 original	2,541		Bajo
1847	VH4-30_I37V_V71K_F78V	VK1-9_GL CDR2	1,309		Bajo
1846	VH4-30_I37V_V71K_F78V	VK3-11 original	1,851		Bajo
1845	VH4-30_I37V_V71K_F78V	VK3-11_GL CDR2	1,277		Bajo
1844	VH4-30_I37V_V71K_F78V	VK1-39 original	2,471		Bajo
1843	VH4-30_I37V_V71K_F78V	VK1-39_GL CDR2	4,407		Bajo
1842	VH4-30_V71K_F78V_V89I	VK1-9 original	3,543		Bajo
1841	VH4-30_V71K_F78V_V89I	VK1-9_GL CDR2	3,311		Bajo
1840	VH4-30_V71K_F78V_V89I	VK3-11 original	1,638		Bajo
1839	VH4-30_V71K_F78V_V89I	VK3-11_GL CDR2	1,547		Bajo
1838	VH4-30_V71K_F78V_V89I	VK1-39 original	1,886		Bajo
1837	VH4-30_V71K_F78V_V89I	VK1-39_GL CDR2	3,024		Bajo
1836	VH4-30_V71K_N76S_F78V	VK1-9 original	2,968		Bajo
1835	VH4-30_V71K_N76S_F78V	VK1-9_GL CDR2	2,988		Bajo
1834	VH4-30_V71K_N76S_F78V	VK3-11 original	2,931		Bajo
1833	VH4-30_V71K_N76S_F78V	VK3-11_GL CDR2	2,263		Bajo
1832	VH4-30_V71K_N76S_F78V	VK1-39 original	2,113		Bajo
1831	VH4-30_V71K_N76S_F78V	VK1-39_GL CDR2	1,888		Bajo
1830	VH4-30_V71K_T73N_F78V	VK1-9 original	2,851		Bajo
1829	VH4-30_V71K_T73N_F78V	VK1-9_GL CDR2	2,53		Bajo
1828	VH4-30_V71K_T73N_F78V	VK3-11 original	2,769		Bajo
1827	VH4-30_V71K_T73N_F78V	VK3-11_GL CDR2	2,403		Bajo
1826	VH4-30_V71K_T73N_F78V	VK1-39 original	3,853		Bajo
1825	VH4-30_V71K_T73N_F78V	VK1-39_GL CDR2	4,494		Bajo
1824	VH4-30_V71K_F78V	VK1-9 original	1,612		Bajo
1823	VH4-30_V71K_F78V	VK1-9_GL CDR2	2,149		Bajo
1822	VH4-30_V71K_F78V	VK3-11 original	1,942		Bajo
1821	VH4-30_V71K_F78V	VK3-11_GL CDR2	1,64		Bajo
1820	VH4-30_V71K_F78V	VK1-39 original	2,458		Bajo
1819	VH4-30_V71K_F78V	VK1-39_GL CDR2	3,228		Bajo
1818	VH4-30_F78V	VK1-9 original	350,7		Bajo

1817	VH4-30_F78V	VK1-9_GL CDR2	771	Bajo
1816	VH4-30_F78V	VK3-11 original	617,8	Bajo
1815	VH4-30_F78V	VK3-11_GL CDR2	215,1	Bajo
1814	VH4-30_F78V	VK1-39 original	no unión	Bajo
1813	VH4-30_F78V	VK1-39_GL CDR2	35,59	Bajo
1812	VH4-30_V71K	VK1-9 original	8,323	Alto
1811	VH4-30_V71K	VK1-9_GL CDR2	9,518	Bajo
1810	VH4-30_V71K	VK3-11 original	17,83	Bajo
1809	VH4-30_V71K	VK3-11_GL CDR2	7,181	Bajo
1808	VH4-30_V71K	VK1-39 original	24,48	Alto
1807	VH4-30_V71K	VK1-39_GL CDR2	181,1	Alto
1806	VH3-7_A24V_R71K	VK1-9 original	12,07	Bajo
1805	VH3-7_A24V_R71K	VK1-9_GL CDR2	1,173	Bajo
1804	VH3-7_A24V_R71K	VK3-11 original	55,61	Bajo
1803	VH3-7_A24V_R71K	VK3-11_GL CDR2	12,59	Bajo
1802	VH3-7_A24V_R71K	VK1-39 original	19,81	Bajo
1801	VH3-7_A24V_R71K	VK1-39_GL CDR2	33,97	Bajo
1800	VH3-7_A24V_L78V	VK1-9 original	1,151	Bajo
1799	VH3-7_A24V_L78V	VK1-9_GL CDR2	2,001	Bajo
1798	VH3-7_A24V_L78V	VK3-11 original	0,5211	Bajo
1797	VH3-7_A24V_L78V	VK3-11_GL CDR2	0,6889	Bajo
1796	VH3-7_A24V_L78V	VK1-39 original	4,543	Bajo
1795	VH3-7_A24V_L78V	VK1-39_GL CDR2	3,963	Bajo
1794	VH3-7_R71K_L78V	VK1-9 original	11,41	Bajo
1793	VH3-7_R71K_L78V	VK1-9_GL CDR2	13,47	Bajo
1792	VH3-7_R71K_L78V	VK3-11 original	14,71	Bajo
1791	VH3-7_R71K_L78V	VK3-11_GL CDR2	19,12	Bajo
1790	VH3-7_R71K_L78V	VK1-39 original	14,64	Bajo
1789	VH3-7_R71K_L78V	VK1-39_GL CDR2	24,37	Bajo
1788	VH3-7_L78V	VK1-9 original	36,45	Bajo
1787	VH3-7_L78V	VK1-9_GL CDR2	32,53	Bajo
1786	VH3-7_L78V	VK3-11 original	87,75	Bajo
1785	VH3-7_L78V	VK3-11_GL CDR2	80,24	Bajo
1784	VH3-7_L78V	VK1-39 original	76,35	Bajo
1783	VH3-7_L78V	VK1-39_GL CDR2	96,87	Bajo
1782	VH1-46_A24V_Q61S_M69I_R71K	VK1-9 original	1,55	Bajo
1781	VH1-46_A24V_Q61S_M69I_R71K	VK1-9_GL CDR2	1,618	Bajo
1780	VH1-46_A24V_Q61S_M69I_R71K	VK3-11 original	1,713	Bajo
1779	VH1-46_A24V_Q61S_M69I_R71K	VK3-11_GL CDR2	1,428	Bajo
1778	VH1-46_A24V_Q61S_M69I_R71K	VK1-39 original	1,292	Bajo
1777	VH1-46_A24V_Q61S_M69I_R71K	VK1-39_GL CDR2	1,588	Bajo
1776	VH1-46_A24V_Q61S_M69I_R71K	VK4-1 original	1,476	Bajo
1775	VH1-46_A24V_Q61S_M69I_R71K	VK4-1_GL CDR2	2,27	Bajo
1774	VH1-46_A24V_M69I_R71K_T73N_T75K	VK1-9 original	1,559	Alto
1773	VH1-46_A24V_M69I_R71K_T73N_T75K	VK1-9_GL CDR2	1,13	Alto
1772	VH1-46_A24V_M69I_R71K_T73N_T75K	VK3-11 original	1,398	Alto
1771	VH1-46_A24V_M69I_R71K_T73N_T75K	VK3-11_GL CDR2	1,456	Alto
1770	VH1-46_A24V_M69I_R71K_T73N_T75K	VK1-39 original	1,535	Alto
1769	VH1-46_A24V_M69I_R71K_T73N_T75K	VK1-39_GL CDR2	0,9681	Alto
1768	VH1-46_A24V_M69I_R71K_T73N_T75K	VK4-1 original	1,573	Bajo
1767	VH1-46_A24V_M69I_R71K_T73N_T75K	VK4-1_GL CDR2	1,233	Bajo
1766	VH1-46_A24V_M69I_R71K_T75K	VK1-9 original	1,193	Alto
1765	VH1-46_A24V_M69I_R71K_T75K	VK1-9_GL CDR2	1,205	Bajo
1764	VH1-46_A24V_M69I_R71K_T75K	VK3-11 original	1,002	Bajo

1763	VH1-46_A24V_M69I_R71K_T75K	VK3-11_GL CDR2	1,317	Alto
1762	VH1-46_A24V_M69I_R71K_T75K	VK1-39 original	1,683	Alto
1761	VH1-46_A24V_M69I_R71K_T75K	VK1-39_GL CDR2	1,372	Alto
1760	VH1-46_A24V_M69I_R71K_T75K	VK4-1 original	1,586	Bajo
1759	VH1-46_A24V_M69I_R71K_T75K	VK4-1_GL CDR2	2,725	Bajo
1758	VH1-46_A24V_M69I_R71K	VK1-9 original	1,584	Alto
1757	VH1-46_A24V_M69I_R71K	VK1-9_GL CDR2	1,307	Bajo
1756	VH1-46_A24V_M69I_R71K	VK3-11 original	1,037	Alto
1755	VH1-46_A24V_M69I_R71K	VK3-11_GL CDR2	2,026	Bajo
1754	VH1-46_A24V_M69I_R71K	VK1-39 original	1,389	Bajo
1753	VH1-46_A24V_M69I_R71K	VK1-39_GL CDR2	0,9743	Bajo
1752	VH1-46_A24V_M69I_R71K	VK4-1 original	1,41	Bajo
1751	VH1-46_A24V_M69I_R71K	VK4-1_GL CDR2	1,649	Bajo
1750	VH1-46_M69I_R71K	VK1-9 original	2,283	Alto
1749	VH1-46_M69I_R71K	VK1-9_GL CDR2	1,54	Bajo
1748	VH1-46_M69I_R71K	VK3-11 original	2,271	Bajo
1747	VH1-46_M69I_R71K	VK3-11_GL CDR2	1,263	Bajo
1746	VH1-46_M69I_R71K	VK1-39 original	1,96	Bajo
1745	VH1-46_M69I_R71K	VK1-39_GL CDR2	1,759	Bajo
1744	VH1-46_M69I_R71K	VK4-1 original	2,291	Bajo
1743	VH1-46_M69I_R71K	VK4-1_GL CDR2	3,014	Bajo
1742	VH1-46_A24V	VK1-9 original	1,883	Bajo
1741	VH1-46_A24V	VK1-9_GL CDR2	1,592	Bajo
1740	VH1-46_A24V	VK3-11 original	1,108	Alto
1739	VH1-46_A24V	VK3-11_GL CDR2	1,818	Bajo
1738	VH1-46_A24V	VK1-39 original	0,8624	Bajo
1737	VH1-46_A24V	VK1-39_GL CDR2	1,634	Bajo
1736	VH1-46_A24V	VK4-1 original	0,7444	Bajo
1735	VH1-46_A24V	VK4-1_GL CDR2	1,731	Bajo

Tabla 8: Datos de unión y AC-SINS de los clones humanizados portadores de retromutaciones.

EJEMPLO 11 las variantes humanizadas muestran un rango de potencia en los

5 ensayos con PBMC humanas y cyno.

Los clones humanizados seleccionados se probaron primero en el ensayo de células reporteras Jurkat TNFR2 humanas. Los resultados de la Tabla 9 muestran que el clon 1765 muestra una EC_{50} similar a la del clon original 854. Tanto el clon 1847 como el 1753 perdieron potencia y, curiosamente, a pesar de ser el aglutinante más fuerte en el ensayo de unión a CHO del TNFR2 humano, el clon 1747 no es un agonista en el ensayo de células reporteras Jurkat.

Tras este resultado, se probaron los clones 1847, 1765 y 1753 en los ensayos con PBMC humanas y de cyno.

Brevemente, se sembraron 250 000 PBMC humanas de varios donantes en los pocillos de una placa de 96 pocillos en medio Optimizer CST. Cada pocillo se trató con 50 ml de 5 ng/ml de IL-2 y 50 ml de 4x anticuerpo anti-TNFR2 o TetraFab durante 72

horas a 37°C. Posteriormente, las células se prepararon para el análisis por citometría de flujo. Tras 2 lavados en PBS, las células se resuspendieron primero en 100 ml de tampón de tinción Live Near IR durante 30 minutos a 4°C. Después de 2 lavados adicionales en tampón de flujo, las células se incubaron con CD3 BV421, ICAM APC

5 CD4 PE y TIGIT BUV395 diluido 1/40 1 hora a 4 °C, después se fijaron con PFA al 1% 15 minutos a temperatura ambiente. Tras 2 lavados adicionales en tampón de flujo, las células se analizaron finalmente por citometría de flujo. La dispersión de la luz se utilizó para excluir los dobletes, y la tinción IR cercana baja como indicación de viabilidad. Las células viables individuales se agruparon en la población CD3+/CD4+/TIGIT+ y se midió

10 la intensidad media de fluorescencia (MFI) de ICAM-1. Se realizó un ajuste de la curva de 4 parámetros en la población de CD3+/CD4+/TIGIT+. Para calcular la EC₅₀ del agonista TNFR2 para la inducción de ICAM-1 se utilizó un ajuste de curva de 4 parámetros en Graph Pad Prism. Se seleccionó ICAM-1 porque se sabe que está regulada por NF-KB, un marcador de activación aguda de linfocitos T, y tiene un papel

15 conocido en la supresión mediada por Treg. Se utilizó TIGIT para identificar una población de linfocitos T maduras enriquecidas para la expresión de TNFR2 y Treg sin tener que teñir para el marcador intracelular FoxP3. Se utilizó una estrategia similar para determinar la activación de linfocitos T en PBMC cyno, aunque la activación de linfocitos T se midió como el porcentaje de células CD4+ doblemente positivas para CD25+/Ki67+

20 debido a las diferencias en la expresión del marcador de activación y la reactividad cruzada de anticuerpos entre humanos y cyno.

Los resultados, en la Tabla 9, confirmaron que el clon humanizado 1765 mostraba una potencia similar al clon original 854 en el ensayo con PBMC humanas, con una EC₅₀ de 1,308 y 1,402 nM respectivamente. La potencia en células cyno fue 10

25 veces menor para ambos clones, con EC₅₀ de 13,63 y 15,02 nM respectivamente. El clon 1753 mostró una potencia menor, especialmente en células cyno PBMC (56 nM) y el clon 1847 no mostró ninguna potencia en ambos tipos celulares. El clon 1765 (secuencia de cadena pesada SEQ 22 y secuencia de cadena ligera SEC 21) se seleccionó para investigaciones posteriores.

30

Nombre del clon	EC ₅₀ de Jurkat ug/ml	EC ₅₀ (HuPBMC) nM	EC ₅₀ (CyPBMC) nM
GBT-TNFR2-0854	1,74	1,402	15,02
GBT-TNFR2-1847	5,97	No agonista	No agonista
GBT-TNFR2-1765	1,01	1,308	13,63
GBT-TNFR2-1753	13,5	4,845	56
GBT-TNFR2-1747	No agonista	No ensayado	No ensayado

Tabla 9: la potencia del clon humanizado se probó en el ensayo de células reporteras

Jurkat y en los ensayos de PBMC humanas y cyno.

EJEMPLO 12 Los anticuerpos anti-TNFR2 agregados muestran una mayor potencia en un ensayo de célula reportera Jurkat NF-KB-GFP

5 Para evaluar el efecto de los agregados en el agonismo del TNFR2, comparamos anticuerpos anti-TNFR2 purificados con un método de 1 paso (purificación ProA solamente, conteniendo una media del 15-20% de agregados) con los mismos anticuerpos purificados con un método de 2 pasos (ProA seguido de purificación SEC, libre de agregados), en un ensayo de célula reportera Jurkat NF-KB-GFP.

10 Brevemente, se sembraron 100.000 células Jurkat NF-KB-GFP/pocillo en una placa de 96 pocillos, en medio RPMI1640 suplementado con 10% FBS, 1x piruvato sódico, 1x Glutamax y Pen/Estrep. A continuación, las células se incubaron durante la noche a 37°C con diluciones seriadas de anticuerpos anti-TNFR2. Al día siguiente, las células se prepararon para el análisis por citometría de flujo del siguiente modo: después
15 de la centrifugación para eliminar el sobrenadante, las células se trataron con tripsina al 0,25% para romper los grumos. Por último, las células se centrifugaron de nuevo, se resuspendieron en 75 ml de tampón de flujo que contenía una dilución 1/1000 del reactivo DAPI y se analizaron en un citómetro de flujo para determinar la expresión de GFP.

Clon	Ensayo de EC ₅₀ de Jurkat ng/ml Con agregados	Ensayo de EC ₅₀ de Jurkat ng/ml Sin agregados	Pérdida de potencia
MR2-1	119,6	5748	50 veces
Clone 162	347,3	7021	20 veces

20 **Tabla 10:** Potencia del ensayo de células reporteras Jurkat de clones con o sin agregados.

El clon 162, elegido como resultado representativo, se comparó con el MR2-1 (Hycult Biotech, ref #HM2007), un agonista del TNFR2 disponible comercialmente.

25 Cuando se purificó en una columna ProA, el clon 162 mostró una potencia similar al MR2-1 (EC₅₀ respectivamente 347,3 y 119,6 ng/ml). Curiosamente, descubrimos que tanto el clon 162 como el MR2-1 contenían una cantidad significativa de agregados, como se observa a continuación en los perfiles analíticos SEC de la Figura 1.

30 Cuando tanto el clon 162 como el MR2-1 estaban desprovistos de agregados, tras su purificación en un SEC, su capacidad para agonizar el TNFR2 en el ensayo de células Jurkat se vio significativamente comprometida, mostrando el clon 162 una pérdida de potencia 20 veces mayor (EC₅₀ = 7,02 mg/ml) y el MR2-1 una pérdida 50

veces mayor ($EC_{50} = 5,75 \text{ mg/ml}$), lo que sugiere que los agregados podrían aumentar artificialmente la potencia de los anticuerpos anti-TNFR2.

Este resultado nos llevó a investigar si el aumento de la valencia podía conducir a un aumento de la potencia.

5

Ejemplo 13 Reformateo a TetraFab

Para probar nuestra hipótesis, intentamos aumentar la valencia del clon 1765 añadiendo paratopos adicionales a su andamiaje IgG existente, reformateándolo a TetraFab 2053 (véase la Figura 2). Como se describe en el esquema, un TetraFab se compone de una cadena pesada Fab doble, con un dominio Fab exterior formado por un dominio variable y un dominio CH1 constante unido por un ligador G4S corto a un Fab interior formado por el mismo dominio variable seguido por el mismo CH1 constante y los CH2 y CH3 de una IgG₁ humana típica. Esta cadena pesada más larga es capaz de asociarse con 4 cadenas ligeras en lugar de 2, creando una molécula compuesta de 4 paratopos y en teoría capaz de unirse a 4 moléculas de TNFR2. Véase SEQ 30 y SEQ 9 para las cadenas pesada y ligera del TetraFab 2053, respectivamente.

La razón de ser del reformateado a TetraFab es imitar la oligomerización del TNFR2 por el TNFa unido a la membrana. De hecho, el TNFa unido a la membrana forma trímeros capaces de agonizar fuertemente el TNFR2 en la superficie de las Tregs, uniendo múltiples moléculas de TNFR2 simultáneamente.

El aumento de la avidéz se confirmó mediante Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) utilizando un BIAcore. Brevemente, se capturó TNFR2 humano o cyno biotinilado en la superficie de un chip de estreptavidina durante 60 segundos a una velocidad de flujo de 10 ml/min. A continuación, se inyectaron los anticuerpos o el TetraFab sobre el TNFR2 capturado en concentraciones que oscilaban entre 10 y 1,25 nM para los anticuerpos, y entre 5 y 0,625 nM para el TetraFab, durante una fase de asociación de 50 segundos a 80 ml/min. Más tarde, se inició la fase de disociación con tampón de funcionamiento (HBS-EP+) inyectado durante 600 segundos a 80 ml/min. Los datos se analizaron con el software de evaluación Biacore.

Analito	ligando	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (nM)
IgG ₂ - 854	HuTNFR2	1,13E+07	1,25E-03	0,11
IgG ₂ - 1765	HuTNFR2	4,20E+06	1,36E-03	0,32 ± 0,1
IgG ₁ TF-2053	HuTNFR2	8,10E+06	4,73E-04	0,06 ± 0,00
IgG ₂ - 854	CyTNFR2	1,12E+07	9,96E-03	0,89
IgG ₂ - 1765	CyTNFR2	4,09E+06	9,77E-03	2,39 ± 0,03

IgG ₁ TF-2053	CyTNFR2	1,15E+07	7,06E-03	0,61
--------------------------	---------	----------	----------	------

Tabla 11: Datos SRP - On-rate (ka), off-rate (kd) y afinidad (KD) del clon original 854, su homólogo humanizado clon 1765 y el correspondiente TetraFab 2053 sobre TNFR2 humano y cyno, calculados utilizando un BIACore.

5 Los datos de la Tabla 11 muestran que tanto el clon original 854 como el clon humanizado 1765 tienen una afinidad aparente similar por el TNFR2 humano, con KDs de 0,11 y 0,32 nM respectivamente. El TetraFab muestra una mayor afinidad aparente con una KD de 0,06 nM, una mejora de 5 veces en comparación con sus homólogos IgG 854 o 1765.

10 Una mejora similar en la afinidad, aunque no tan grande, puede observarse para el cyno TNFR2. La afinidad del TetraFab por el cyno TNFR2 es 10 veces menor que por el TNFR2 humano (KDs de 0,61 y 0,06 nM respectivamente).

Ejemplo 14 Anticuerpos anti-TNFR2 y TetraFab agonizan TNFR2 en un ensayo de células reporteras Jurkat NF-KB-GFP

15 En primer lugar, se comprobó la capacidad del TetraFab para inducir la expresión de NF-KB-GFP en un ensayo con células Jurkat reporteras que expresan TNFR2 utilizado anteriormente. Del mismo modo, se sembraron 100.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos, en medio RPMI1640 suplementado con 10 % de FBS, 1x piruvato
20 sódico, 1x Glutamax y Pen/Estrep e incubado durante la noche a 37°C con diluciones seriadas de anticuerpo anti-TNFR2 o TetraFab. Al día siguiente, las células se prepararon para el análisis por citometría de flujo como se hizo con anterioridad y se analizaron en un citómetro de flujo para la expresión de GFP.

25 Los resultados resumidos en la Tabla 12 muestran que el clon original 854 y su variante humanizada 1765 tienen una EC₅₀ similar de 0,526 mg/ml y 1,009 mg/ml respectivamente. Por otro lado, la EC₅₀ del TetraFab 2053 muestra una mejora de más de 10 veces en comparación tanto con el 854 como con el 1765, con una EC₅₀ de 0,037 mg/ml. Este resultado sugiere que una mayor valencia promueve una mayor potencia.

Clon	EC ₅₀ Jurkat µg/ml
854	0,526
1765	1,009
2053	0,037

30 **Tabla 12:** Potencia del original 854, su homólogo humanizado 1765 y el correspondiente TetraFab 2053 en el ensayo de células reporteras Jurkat TNFR2.

Ejemplo 15 Anticuerpos anti-TNFR2 y TetraFab inducen la regulación hacia arriba

de ICAM-1 en PBMC CD3+CD4+TIGIT+ humanas y la coexpresión Ki67/CD25 en células CD4+ en cyno PBMC

A continuación, se comprobó la capacidad del TetraFab para aumentar la regulación de ICAM-1 en una población de linfocitos T primarias que expresan TNFR2 (CD3+CD4+TIGIT+), como se describe a continuación. Se seleccionó ICAM-1 porque está regulada por NF-KB, se sabe que es un marcador de activación aguda de linfocitos T y tiene un papel conocido en la supresión mediada por Treg. TIGIT se utilizó para identificar una población de linfocitos T maduros enriquecidos para la expresión de TNFR2 y Treg sin tener que teñir para el marcador intracelular FoxP3.

Brevemente, se sembraron 250.000 PBMC humanas de varios donantes en los pocillos de una placa de 96 pocillos en medio Optimizer CST. Cada pocillo se trató con 50 ml de 5 ng/ml de IL-2 y 50 ml de 4x anticuerpo anti-TNFR2 o TetraFab durante 72 horas a 3 °C. Posteriormente, las células se prepararon para el análisis por citometría de flujo. Después de 2 lavados en PBS, las células se resuspendieron primero en 100 ml de tampón de tinción Live Near IR durante 30 minutos a 4°C. Después de 2 lavados adicionales en tampón de flujo, las células se incubaron con CD3 BV421, ICAM APC CD4 PE y TIGIT BUV395 diluido 1/40 1 hora a 4°C, y después se fijaron con PFA al 1% 15 minutos a temperatura ambiente (todos los reactivos se resumen en la Tabla 13). Tras 2 lavados adicionales en tampón de flujo, las células se analizaron finalmente por citometría de flujo. Se utilizó la dispersión de la luz para excluir los dobletes y la tinción IR cercana baja como indicación de viabilidad. Las células viables individuales se separaron en la población CD3+/CD4+/TIGIT+ y se midió la MFI de ICAM-1 para ICAM-1. Se realizó un ajuste de la curva de 4 parámetros en la población de células viables. Para calcular la EC₅₀ del agonista TNFR2 para la inducción de ICAM-1 se utilizó un ajuste de curva de 4 parámetros en Graph Pad Prism. Se utilizó una estrategia similar para determinar la activación de linfocitos T en PBMC cyno, aunque la activación de linfocitos T se midió como el porcentaje de células CD4+ doblemente positivas para CD25+/Ki67+ debido a las diferencias en la expresión del marcador de activación y la reactividad cruzada de anticuerpos entre humanos y cyno.

Anticuerpos humanos para citometría de flujo	Vendedor	Catálogo N.º	Clon
CD3 BV421	BD Pharmingen	562426	UCHT1
ICAM APC	BD Pharmingen	559771	HA58 (RUO)
CD4 PE	BD Pharmingen	555347	RPA-T4
TIGIT BUV395	BD OptiBuild	747845	741182

30

Anticuerpos de citometría de flujo de Cyno	Vendedor	Catálogo N.º	Clon
CD3 BUV395	BD Pharmingen	564088	SP-34
CD25 APC	eBioscience	17-0257-42	CD25-4E3

CD4 FITC	BD Pharmingen	550628	L200
Ki-67 PE-eFluor710	Invitrogen	46-5698-82	SOLA15

Tabla 13: reactivos utilizados para los ensayos con PBMC humanas y cyno

Como se observa en la Tabla 14 y de forma similar a los resultados del ensayo Jurkat NF-KB-GFP, la EC_{50} para la regulación hacia arriba de ICAM-1 humana en la superficie de células CD3+CD4+TIGIT+ humanas es similar entre el anticuerpo original 854 y el anticuerpo humanizado 1765 (1,402 y 1,308 mg/ml respectivamente). La EC_{50} para la regulación hacia arriba de ICAM-1 se multiplica por 10 tras el tratamiento con el TetraFab 2053, lo que confirma que el aumento de la valencia mejorará la potencia, incluso cuando el número de receptores de la superficie celular TNFR2 sea bajo (11.000 en Jurkat, <500 en Treg humanas).

Clon	EC_{50} HuPBMC μ g/ml	EC_{50} CyPBMC μ g/ml
854	1,402	27,22
1765	1,308	13,63
2053	0,116	5,950

Tabla 14: Potencia del 854 original, su homólogo humanizado 1765 y el correspondiente TetraFab 2053 en los ensayos con PBMC humanas y cyno.

Ejemplo 16 TetraFab 2053 provoca la degradación de IKBa inducida por el agonismo de TNFR2 en cultivos de Tregs humanas y cyno

El siguiente ensayo se utilizó como sustituto de la activación de NF-KB resultante del agonismo de TNFR2. También permitió una comparación directa de la farmacología de los anticuerpos anti-TNFR2 entre Tregs humanos y cyno utilizando el mismo criterio de valoración.

Brevemente, los linfocitos Treg naturales humanas o cyno seleccionadas a partir de PBMC de varios donantes y expandidas mediante múltiples ciclos de estimulación anti-CD3/28 en presencia de IL-2 y rapamicina se estimularon durante la noche a 37°C en medios que contenían 10 ng/ml de IL2 recombinante humana o cyno, respectivamente. Al día siguiente, las células se sembraron en placas de 96 pocillos profundos (> 50.000 células/pocillo) y se trataron con diversas concentraciones de TetraFab 2053, PMA/ionomicina (PMA 40 ng/ml; Ionomicina 2 mM, control positivo para IKBa) o medios (control no estimulado) durante 20 minutos a 37°C. Tras la incubación, las células se lavaron, fijaron, permeabilizaron y tiñeron con un anticuerpo anti-IKBa-PE 30 minutos a 4°C. Por último, las células se analizaron en un citómetro de flujo y el nivel de degradación de IKBa se evaluó mediante MFI.

Donante humano N.º	EC ₅₀ humana	Donante de cyno N.º	EC ₅₀ de cyno
D28 humano	20 pM	16-873 de cyno	53,8 pM
D32 humano	37,3 pM	3 de cyno	2,248 nM
D23 humano	47,79 pM	16-477 de cyno	117,7 pM
D24 humano	5,75 pM	18-7469 de cyno	400 pM
D28 humano	17,9 pM	18-7473 de cyno	155 pM

Tabla 15: potencia del TeraFab 2053 en el ensayo de degradación de IKBa humano y cyno.

Como se detalla con anterioridad en la Tabla 15, la EC₅₀ media para IKBa en Tregs humanos expandidos fue de 26 +/- 17 pM (n = 5) mientras que la de Tregs cyno expandidos fue de 145 +/- 154 pM (n = 5). A pesar de la significativa variabilidad en los resultados entre las Treg expandidas a partir de donantes individuales de Treg humanas y cyno, estos datos muestran una activación consistente de la vía NF-KB en las Treg y una pérdida de potencia en las cyno de más de 5 veces frente a las humanas.

10

Ejemplo 17 Anti-TNFR2 TetraFab induce la regulación hacia arriba de OX-40 en esplenocitos humanos y cyno en ausencia de IL-2.

Desde que los estudios farmacológicos en cyno revelaron la activación de las Treg tisulares tras la administración in vivo, como indica la regulación hacia arriba de OX-40, miembro de la superfamilia del TNF, se estableció un ensayo ex vivo para generar valores de EC₅₀ para la activación de las Treg residentes en el tejido utilizando TeraFab 2053. En este ensayo, se descongelaron esplenocitos humanos o cyno congelados de varios donantes y se trataron con varias concentraciones de TetraFab 2053 durante 22 horas a 37°C. A continuación, las muestras se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con los siguientes anticuerpos: CD4-BV786, FoxP3-AF647, OX40-BV421, CD3-BV605, Tigit-A488, CD25-PE-Cy5 y CD45-PE-Cy7, antes de ser analizadas por citometría de flujo. Las Treg residentes en el tejido se identificaron como únicas/vivas/CD45+/CD3+/CD4+/CD25+/FoxP3+ y la MFI de OX-40 se utilizó para generar curvas EC₅₀ en GraphPad Prism utilizando un ajuste de curva de 4 parámetros. Los valores EC₅₀ individuales generados para cada donante de esplenocitos humanos o cyno congelados se presentan en esta tabla. La Tabla 16 resume los resultados obtenidos.

25

Donante humano N.º	EC ₅₀ humana	Donante de Cyno N.º	EC ₅₀ de Cyno
ZenBio #072518	47 pM	TA1	642 pM
BioIVT #BRH1515663	18 pM	17-5215	1752 pM
		TA2	692 pM
		#31	799 pM
		#34	905 pM

Tabla 16: Potencia del TetraFab 2053 para inducir la regulación hacia arriba de OX-40

en esplenocitos humanos y cyno en ausencia de IL-2.

La EC₅₀ media para la regulación de OX-40 en las Treg esplénicas humanas fue de 33 +/- 21 pM (n = 2), similar a la EC₅₀ para la degradación de IKBa en las Treg de sangre humana expandida, mientras que la EC₅₀ para la regulación de OX-40 en las
5 Treg esplénicas de cyno fue de 958 +/- 455 pM (n = 5).

Ejemplo 18 Farmacología in vivo de tetraFab 2053 en monos cynomolgus

Los monos cynomolgus macho y hembra de origen mauriciano, de más de 2,5 años de edad, fueron aclimatados durante un mínimo de 30 días antes de iniciar la
10 dosificación. A los grupos de dosis que contenían un animal macho (M) y un animal hembra (F) se les administró, ya sea, el vehículo de control, o 20 mg/kg, 60 mg/kg o 180 mg/kg de TetraFab 2053 mediante inyección intravenosa (IV) los días 1, 4, 8, 11 y 15. Tras la administración de TetraFab 2053, se les administró el vehículo de control. Tras la administración de TetraFab 2053 el Día 11, se recogió sangre en varios puntos
15 temporales a lo largo de 96 horas para realizar análisis toxicocinéticos. El día 16, se practicó la eutanasia a todos los animales y se recogió una porción de cada bazo para el análisis fenotípico de Treg. Se prepararon suspensiones unicelulares de esplenocitos por métodos rutinarios y luego se tiñeron los leucocitos con paneles de anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia que reconocían marcadores de superficie e
20 intracelulares utilizados para identificar y caracterizar las Treg. Los linfocitos teñidos se analizaron por citometría de flujo para los siguientes fenotipos:

- Treg que expresan OX40: CD45+CD3+CD4+FoxP3+OX40+
- Treg que expresan TIGIT: CD45+CD3+CD4+FoxP3+TIGIT+
- Treg proliferantes: CD45+CD3+CD4+FoxP3+Ki-67+

25 Los porcentajes y las intensidades medias de fluorescencia (MFI) de Treg que expresan OX40 o TIGIT, y los porcentajes de Treg proliferantes se determinaron utilizando software de análisis de citometría de flujo. En la Tabla 17 se muestran los aumentos de los parámetros Treg en los animales tratados con TetraFab 2053 en comparación con los controles con vehículo emparejados por sexo. Se determinaron las
30 concentraciones totales de TetraFab 2053 en suero mediante un ensayo de unión a ligando y se evaluaron las concentraciones del área bajo la curva (AUC) del día 11-15 para cada animal individual como se muestra a continuación en la Tabla 17.

Medición in vivo			Sexo	Incremento en veces en comparación con control de vehículo		
Población	Parámetro			20 mg/kg	60 mg/kg	180 mg/kg
Treg que expresa OX40	Porcentaje de	M		1,66	1,83	1,68
	FoxP3+ Treg	F		1,93	3,00	3,14
	OX40 MFI	M		1,43	1,32	1,08
		F		2,23	2,46	1,90
Treg que expresa TIGIT	Porcentaje de	M		1,64	1,27	1,76
	FoxP3+ Treg	F		1,67	1,63	1,75
	TIGIT MFI	M		1,26	1,45	1,36
		F		2,09	2,44	1,88
Treg proliferante	Porcentaje de	M		2,25	1,53	2,27
	FoxP3+ Treg	F		1,94	1,86	2,07
Exposición sérica (Días 11-15)			Sexo	AUC _{0-96h} (µg*h/mL)		
				20 mg/kg	60 mg/kg	180 mg/kg
TetraFab 2053 total			M	5260	14100	64000
			F	11800	52500	175000

Tabla 17: resumen de las mediciones in vivo realizadas en monos cynomolgus inyectados con varias dosis de TetraFab 2053.

La administración de TetraFab 2053 a monos cynomolgus machos y hembras en dosis de 20 a 180 mg/kg/dosis IV durante 16 días aumentó la expresión de OX-40 y TIGIT en las Treg esplénicas hasta 3,14 veces y 2,44 veces, respectivamente, en comparación con los controles tratados con vehículo, y aumentó la proporción de Treg esplénicas en proceso de proliferación hasta 2,27 veces. Los aumentos de estos marcadores de activación de las Treg se observaron en todos los niveles de dosis, tanto en machos como en hembras, y en general no siguieron una relación dosis-respuesta, lo que probablemente refleja una actividad farmacológica máxima.

La exposición sistémica aumentó con el aumento de la dosis de forma aproximadamente proporcional a la dosis de 20 a 60 mg/kg y más que proporcional a la dosis de 60 a 180 mg/kg en monos cynomolgus machos. La exposición sistémica en general aumentó con el aumento de la dosis de forma más que proporcional a la dosis de 20 a 180 mg/kg en monos cynomolgus hembra.

Ejemplo 19 El TetraFab 2053 muestra una desarrollabilidad aceptable

Para confirmar que el TetraFab 2053 era un candidato adecuado para su posterior desarrollo como bioterapéutico, se completaron una serie de ensayos bioanalíticos (véase la Tabla 18).

Categorías de evaluación de la desarrollabilidad		GBT-TNFR2-2053 (Tetrafab)
Autorización de no especificidad/PK	AC-SINS	aceptable
	Puntaje de ADN ELISA	aceptable
	Puntaje de ELISA insulínico	aceptable
	columna HuFcRn rET	aceptable
Propiedades fisicoquímicas	Estabilidad térmica	Aceptable
	Bajo pH mantenido	Aceptable a pH 3,4 (glicina)
	Viscosidad	Alto pero puede ser manejable con formulación tampón
	Estabilidad a alta concentración 6 semanas a 4 y 25°C	Estabilidad aceptable a 4°C <5 % de aumento % de HMMS a 25°C
	Estudio de degradación forzada 4 semanas a 40°C	Aceptable

Tabla 18: resumen de los ensayos biofísicos realizados en TeraFab 2053 para evaluar su desarrollabilidad.

- Los resultados, resumidos en la Tabla anterior, mostraron que el TetraFab 2053 presenta propiedades de inespecificidad aceptables. Además, la molécula fue estable cuando se probó a alta concentración durante 6 semanas a 4°C y 4 semanas a 40°C. Por último, el TetraFab 2053 mostró cierta viscosidad a altas concentraciones, pero esta característica indeseable puede controlarse con la formulación de tampones. En conjunto, estos resultados sugieren que el TetraFab 2053 es adecuado para su fabricación como bioterapéutico.

EJEMPLO 16 Optimización del TetraFab 2053

- Los siguientes aminoácidos que se muestran en la Tabla 19 fueron objeto de optimización, para eliminar las responsabilidades de secuencia (sitio de desamidación DE, sitio de oxidación W, epítipo de linfocitos T predicho) y disminuir la hidrofobicidad.

Mutaciones (numeración de Kabat)	Propósito
Cadena pesada – W52K, V54Q	Parche hidrofóbico y sitio de oxidación
Cadena pesada – W52R, V54E	
Cadena pesada – W52F, G53Q, V54E	
Cadena pesada – W52L, V54H	
Cadena pesada – W52H, V54S	
Cadena pesada - W97S, D98T	Sitio de oxidación y sitio de desamidación
Cadena pesada - W97H	Sitio de oxidación
Cadena pesada - W97R	
Cadena pesada - W97Q	
Cadena ligera – S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	Epítipo de linfocito T predicho
Cadena ligera – S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	
Cadena ligera – Q89L, Y91K	
Cadena ligera – Q89L	

Tabla 19: mutaciones de aminoácidos introducidas en TeraFab 2053 para eliminar una serie de responsabilidades de secuencia y disminuir la hidrofobicidad.

Los constructos de optimización se hicieron en formatos IgG y TetraFab, y las diversas mutaciones descritas con anterioridad se probaron solas o en combinación, para la unión a TNFR2 CHO humano, como se resume en la Tabla 20:

TetraFabs	IgGs	Cadena pesada	Cadena ligera	Unión de IgG CHO	Unión de TetraFab CHO
2083	1917	W52K, V54Q	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2112	1926	W52K, V54Q	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2141	1935	W52K, V54Q	Q89L, Y91K	no	no
2170	1944	W52K, V54Q	Q89L	no	no
2054	1908	W52K, V54Q	original	no	no
2092	1973	W52K, V54Q, W97S, D98T	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2121	1993	W52K, V54Q, W97S, D98T	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2150	2013	W52K, V54Q, W97S, D98T	Q89L, Y91K	no	no
2179	2033	W52K, V54Q, W97S, D98T	Q89L	no	no
2063	1953	W52K, V54Q, W97S, D98T	Original	no	no
2093	1974	W52K, V54Q, W97H	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2122	1994	W52K, V54Q, W97H	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2151	2014	W52K, V54Q, W97H	Q89L, Y91K	no	no
2180	2034	W52K, V54Q, W97H	Q89L	no	no
2064	1954	W52K, V54Q, W97H	Original	no	no
2094	1975	W52K, V54Q, W97R	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2123	1995	W52K, V54Q, W97R	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2152	2015	W52K, V54Q, W97R	Q89L, Y91K	no	no
2181	2035	W52K, V54Q, W97R	Q89L	no	no
2065	1955	W52K, V54Q, W97R	Original	no	no
2095	1976	W52K, V54Q, W97Q	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2124	1996	W52K, V54Q, W97Q	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2153	2016	W52K, V54Q, W97Q	Q89L, Y91K	no	no
2182	2036	W52K, V54Q, W97Q	Q89L	no	no
2066	1956	W52K, V54Q, W97Q	Original	no	no
2084	1918	W52R, V54E	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2113	1927	W52R, V54E	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2142	1936	W52R, V54E	Q89L, Y91K	no	no
2171	1945	W52R, V54E	Q89L	no	no
2055	1909	W52R, V54E	original	no	no

2096	1977	W52R, V54E, W97S, D98T	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2125	1997	W52R, V54E, W97S, D98T	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2154	2017	W52R, V54E, W97S, D98T	Q89L, Y91K	no	no
2183	2037	W52R, V54E, W97S, D98T	Q89L	no	no
2067	1957	W52R, V54E, W97S, D98T	Original	no	no
2097	1978	W52R, V54E, W97H	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2126	1998	W52R, V54E, W97H	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2155	2018	W52R, V54E, W97H	Q89L, Y91K	no	no
2184	2038	W52R, V54E, W97H	Q89L	no	no
2068	1958	W52R, V54E, W97H	Original	no	no
2098	1979	W52R, V54E, W97R	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2127	1999	W52R, V54E, W97R	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2156	2019	W52R, V54E, W97R	Q89L, Y91K	no	no
2185	2039	W52R, V54E, W97R	Q89L	no	no
2069	1959	W52R, V54E, W97R	Original	no	no
2099	1980	W52R, V54E, W97Q	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2128	2000	W52R, V54E, W97Q	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2157	2020	W52R, V54E, W97Q	Q89L, Y91K	no	no
2186	2040	W52R, V54E, W97Q	Q89L	no	no
2070	1960	W52R, V54E, W97Q	Original	no	no
2085	1919	W52F, G53Q, V54E	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2114	1928	W52F, G53Q, V54E	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2143	1937	W52F, G53Q, V54E	Q89L, Y91K	no	no
2172	1946	W52F, G53Q, V54E	Q89L	no	no
2056	1910	W52F, G53Q, V54E	original	no	no
2100	1981	W52F, G53Q, V54E, W97S, D98T	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2129	2001	W52F, G53Q, V54E, W97S, D98T	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2158	2021	W52F, G53Q, V54E, W97S, D98T	Q89L, Y91K	no	no
2187	2041	W52F, G53Q, V54E, W97S, D98T	Q89L	no	no
2071	1961	W52F, G53Q, V54E, W97S, D98T	Original	no	no
2101	1982	W52F, G53Q, V54E, W97H	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2130	2002	W52F, G53Q, V54E, W97H	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2159	2022	W52F, G53Q, V54E, W97H	Q89L, Y91K	no	no

2188	2042	W52F, W97H	G53Q, V54E,	Q89L	no	no
2072	1962	W52F, W97H	G53Q, V54E,	Original	no	no
2102	1983	W52F, W97R	G53Q, V54E,	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2131	2003	W52F, W97R	G53Q, V54E,	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2160	2023	W52F, W97R	G53Q, V54E,	Q89L, Y91K	no	no
2189	2043	W52F, W97R	G53Q, V54E,	Q89L	no	no
2073	1963	W52F, W97R	G53Q, V54E,	Original	no	no
2103	1984	W52F, W97Q	G53Q, V54E,	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2132	2004	W52F, W97Q	G53Q, V54E,	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2161	2024	W52F, W97Q	G53Q, V54E,	Q89L, Y91K	no	no
2190	2044	W52F, W97Q	G53Q, V54E,	Q89L	no	no
2074	1964	W52F, W97Q	G53Q, V54E,	Original	no	no
2086	1920	W52L, V54H		S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2115	1929	W52L, V54H		S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2144	1938	W52L, V54H		Q89L, Y91K	no	no
2173	1947	W52L, V54H		Q89L	no	no
2057	1911	W52L, V54H		original	no	no
2104	1985	W52L, D98T	V54H, W97S,	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2133	2005	W52L, D98T	V54H, W97S,	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2162	2025	W52L, D98T	V54H, W97S,	Q89L, Y91K	no	no
2191	2045	W52L, D98T	V54H, W97S,	Q89L	no	no
2075	1965	W52L, D98T	V54H, W97S,	Original	no	no
2105	1986	W52L, V54H, W97H		S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2134	2006	W52L, V54H, W97H		S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2163	2026	W52L, V54H, W97H		Q89L, Y91K	no	no
2192	2046	W52L, V54H, W97H		Q89L	no	no
2076	1966	W52L, V54H, W97H		Original	no	no
2106	1987	W52L, V54H, W97R		S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2135	2007	W52L, V54H, W97R		S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2164	2027	W52L, V54H, W97R		Q89L, Y91K	no	no
2193	2047	W52L, V54H, W97R		Q89L	no	no
2077	1967	W52L, V54H, W97R		Original	no	no

2107	1988	W52L, V54H, W97Q	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2136	2008	W52L, V54H, W97Q	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2165	2028	W52L, V54H, W97Q	Q89L, Y91K	no	no
2194	2048	W52L, V54H, W97Q	Q89L	no	no
2078	1968	W52L, V54H, W97Q	Original	no	no
2087	1921	W52H, V54S	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2116	1930	W52H, V54S	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2145	1939	W52H, V54S	Q89L, Y91K	no	no
2174	1948	W52H, V54S	Q89L	no	no
2058	1912	W52H, V54S	original	no	no
2108	1989	W52H, V54S, W97S, D98T	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2137	2009	W52H, V54S, W97S, D98T	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2166	2029	W52H, V54S, W97S, D98T	Q89L, Y91K	no	no
2195	2049	W52H, V54S, W97S, D98T	Q89L	no	no
2079	1969	W52H, V54S, W97S, D98T	Original	no	no
2109	1990	W52H, V54S, W97H	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2138	2010	W52H, V54S, W97H	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2167	2030	W52H, V54S, W97H	Q89L, Y91K	no	no
2196	2050	W52H, V54S, W97H	Q89L	no	no
2080	1970	W52H, V54S, W97H	Original	no	no
2110	1991	W52H, V54S, W97R	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2139	2011	W52H, V54S, W97R	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2168	2031	W52H, V54S, W97R	Q89L, Y91K	no	no
2197	2051	W52H, V54S, W97R	Q89L	no	no
2081	1971	W52H, V54S, W97R	Original	no	no
2111	1992	W52H, V54S, W97Q	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2140	2012	W52H, V54S, W97Q	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2169	2032	W52H, V54S, W97Q	Q89L, Y91K	no	no
2198	2052	W52H, V54S, W97Q	Q89L	no	no
2082	1972	W52H, V54S, W97Q	Original	no	no
2088	1922	W97S, D98T	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2117	1931	W97S, D98T	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2146	1940	W97S, D98T	Q89L, Y91K	no	no
2175	1949	W97S, D98T	Q89L	no	no
2059	1913	W97S, D98T	original	no	no
2089	1923	W97H	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no

2118	1932	W97H	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2147	1941	W97H	Q89L, Y91K	no	no
2176	1950	W97H	Q89L	no	no
2060	1914	W97H	original	no	no
2090	1924	W97R	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2119	1933	W97R	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2148	1942	W97R	Q89L, Y91K	no	no
2177	1951	W97R	Q89L	no	no
2061	1915	W97R	original	no	no
2091	1925	W97Q	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2120	1934	W97Q	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2149	1943	W97Q	Q89L, Y91K	no	no
2178	1952	W97Q	Q89L	no	no
2062	1916	W97Q	original	no	no
2206	2202	Original	S92N, Y94del, P95del, L96Y, T97P	no	no
2207	2203	Original	S92Y, Y94del, P95del, L96T, T97P	no	no
2208	2204	Original	Q89L, Y91K	1,63nM	2,30nM
2209	2205	Original	Q89L	0,43nM	0,15nM
2053	1765	Original	original	0,67nM	0,70nM

Tabla 20: Unión a células CHO TNFR2 humanas de los clones de optimización en formato IgG y TetraFab.

- Sorprendentemente, todos los clones, excepto 2 pares de IgG y TetraFab, perdieron completamente su capacidad de unirse al TNFR2 humano expresado en la superficie de las células CHO. Los clones TetraFab 2208/IgG 2204 y TetraFab 2209/IgG 2205 aún eran capaces de unirse a TNFR2 como IgG y TetraFab, pero la Emax disminuyó significativamente en comparación con los clones originales 2053/1765. Estos clones solo estaban mutados en la CDR3-VL, eliminando un epítipo de linfocitos T previsto. Los análisis in vitro (no mostrados) mostraron que el epítipo de linfocitos T predicho del TetraFab 2053 no se presenta en la superficie de las células presentadoras de antígeno, y un péptido superpuesto al epítipo de linfocitos T predicho no activa los linfocitos T CD4+, lo que sugiere que el riesgo de inmunogenicidad provocado por ese epítipo de linfocitos T predicho es bajo, y por lo tanto no se presentaron estas variantes de optimización.

EJEMPLO 17 TF-2053 proporciona un beneficio de supervivencia a largo plazo en el modelo NSG-GVHD

Objetivo: Probar la eficacia profiláctica de TetraFab-2053 humano en la prevención de la GVHD del xenoinjerto

La transferencia de células mononucleares humanas de sangre periférica (CMSP) a ratones inmunodeficientes carentes de diferenciación celular linfoide endógena (NOD-SCID gamma common chain knockout, NSG) provoca una enfermedad de injerto versus huésped (GVHD) mediada predominantemente por los linfocitos CD4+ y CD8+ humanos transferidos[1]. Los linfocitos humanos transferidos no se someten a educación tímica en los ratones receptores y, por lo tanto, no son tolerados por las proteínas de ratón presentadas en el contexto de las moléculas de clase I y II del locus principal de histocompatibilidad (MHC) de ratón [2]. Las células CD4+ y CD8+ humanas reactivas al ratón maduran y proliferan en el transcurso de semanas hasta convertirse en células efectoras de memoria que liberan cantidades copiosas de citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNFa) y el interferón gamma (IFNg), lo que, además de un extenso infiltrado inflamatorio tisular, provoca disfunción orgánica, pérdida de peso corporal y muerte [1]. El modelo de NSG de GvHD se utiliza a menudo en este campo para demostrar el papel de las proteínas expresadas por los linfocitos humanos en la mediación de la activación, expansión y funciones efectoras de los linfocitos T. Se eligió este modelo para demostrar el papel del TNFR2 agonizante en la reducción de la expansión, activación y función fisiopatológica de los linfocitos T efectoras humanas en un modelo independiente de la supervivencia de los linfocitos T reguladoras (Treg) humanas. La muerte celular inducida por la activación de linfocitos T efectoras a través del agonismo del TNFR2 se ha demostrado previamente *in vitro* [3] pero no *in vivo* para linfocitos T humanos, aunque se ha documentado en el ratón que el TNFR2 es responsable de frenar algunas actividades de linfocitos T CD8 autorreactivas [4].

Métodos:

Resumen: Se adquirieron ratones NSG de 8-9 semanas de edad en los laboratorios Jackson y se aclimataron en el vivario de Pfizer. Todo el uso y manejo de los animales se realizó según protocolos aprobados por el IACUC. Se administró TetraFab-2053 o un tetraFab de control de isotipo a 3 mg/kg, 10 ml/kg quincenalmente durante todo el experimento, empezando 1 día antes de la administración de PBMC humanas. Las PBMC humanas previamente criopreservadas se descongelaron el día 0 del experimento, se lavaron en PBS y se administraron por vía IV a $10 \times 10^6/0,1$ ml de PBS por ratón, n=20 ratones por grupo. Las cohortes se formaron basándose en la aleatorización de los pesos corporales previos al estudio. Se midió el peso corporal 2

veces por semana hasta el sacrificio en el día 78. Se recogió sangre a intervalos de 2 semanas para medir el injerto/expansión de células humanas, la distribución CD4/CD8, así como los marcadores de anergia, agotamiento y senescencia de linfocitos T mediante citometría de flujo y los niveles circulantes de citoquinas humanas mediante ensayo electroquimioluminiscente MSD. Los ratones que perdieron más del 20% de BW fueron eutanasiados de acuerdo con el protocolo IACUC y todos los ratones restantes fueron sacrificados en el día 78. Al momento del sacrificio, se registraron los pesos del bazo y el hígado y se realizaron análisis citométricos de flujo de los esplenocitos, así como también en la sangre.

10 Resultados:

TF2053 proporciona un beneficio de supervivencia a largo plazo en el modelo NSG-GVHD (Figura 3, Tabla 21). TF2053 reduce la pérdida de peso corporal en el modelo de NSG-GVHD (Figura 4, Tabla 22). Además, en el modelo de NSG GVHD, TF2053 reduce las citoquinas humanas circulantes IFN γ , IL10, IL17A, TNF α (Figuras 5-8, y Tablas 23-26). TF2053 reduce el peso del hígado y el bazo en el momento del sacrificio en el modelo de NSG GVHD (Figuras 9 y 10, Tablas 27 y 28). TF2053 reduce el injerto de células humanas en el transcurso del modelo de NSG GVHD, medido por CD45+, CD4+ y CD8+, (Figuras 11-13, Tablas 27-29). El TF2053 reduce las células anérgicas y aumenta las células CD8+ senescentes y agotadas en el transcurso del modelo de NSG GVHD (Figuras 14-16, Tablas 32-34). El TF2053 modifica la proporción de injertos CD4:CD8 (Figura 12, Tabla 30).

PBS (no PBMC)	Ig de control	TetraFab-2053
100	30	75

Tabla 21: Supervivencia en el día 78 (% de la población inicial). Estadística: Prueba de rangos logarítmicos (Mantel-Cox). Los datos también se muestran en la Figura 3.

PBS (no PBMC)	Ig de control	TF2053
10,0	-7,8	5,6

25 Tabla 22: Cambio porcentual del peso corporal frente al valor inicial. Los datos también se muestran en la Figura 4.

	PBS	Ig de control 3 mpk	TF2053 3 mpk	
Día 14	0	2719	11734	***
Día 28	0	67924	12201	***
Día 42	0	89370	14523	***
Día 53	0	80091	13457	***

Tabla 23: Media de IFN γ humano en plasma (pg/ml). *** $p < 0,001$ TF2053 frente a Ig

de control. Los datos también se muestran en la Figura 5.

	PBS	Ig de control 3 mpk	TF2053 3 mpk	
Día 14	0,1	1,7	1,0	
Día 28	0,1	13,8	0,6	***
Día 42	0,0	9,9	0,9	***
Día 53	0,0	8,2	0,8	***

Tabla 24: Media IL10 humana en plasma (pg/ml). *** $p < 0,001$ TF2053 frente a Ig de control. Los datos también se muestran en la Figura 6.

5

	PBS	Ig de control 3 mpk	TF2053 3 mpk	
Día 14	0	3	6	
Día 28	0	132	26	**
Día 42	0	636	30	***
Día 53	1	707	34	***

Tabla 25: Media IL17A humana en plasma (pg/ml). ** $p < 0,01$ TF2053 frente a Ig de control. *** $p < 0,001$ TF2053 frente al Ig de control. Los datos también se muestran en la Figura 7.

	PBS	Ig de control 3 mpk	TF2053 3 mpk	
Día 14	0,0	1,2	4,2	***
Día 28	0,0	26,7	5,0	***
Día 42	0,2	17,6	4,0	***
Día 53	0,0	16,0	3,9	***

10 Tabla 26: Media TNF α humano en plasma (pg/ml). *** $p < 0,001$ TF2053 frente a Ig de control. Estadística: prueba t de Student no apareada de 2 colas. Los datos también se muestran en la Figura 8.

	PBS	Ig de control 3 mpk	TF2053 3 mpk	
Día 11-78	0,0395	0,0620	0,0465	***

Tabla 27: Peso medio del hígado por peso corporal en el momento del sacrificio (mg/kg).

15 *** $p < 0,001$ TF2053 frente a Ig de control. Los datos también se muestran en la Figura 9.

	PBS	Ig de control 3 mpk	TF2053 3 mpk	
Día 11-78	0,0009	0,0061	0,0027	***

Tabla 28: Peso medio del bazo por peso corporal en el momento del sacrificio (mg/kg).

20 *** $p < 0,001$ TF2053 frente a Ig de control. Estadística: prueba t de Student no apareada de 2 colas. Los datos también se muestran en la Figura 10.

	Ig de control 3 mpk	TF2053 3 mpk	
Día 14	1,2	4,2	***
Día 28	26,7	4,9	**
Día 42	17,6	4,0	****
Día 53	16,0	3,9	***

Tabla 29: Porcentaje medio de células CD45+ humanas en leucocitos de sangre total.

** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$. **** $p < 0,0001$. Datos también mostrados en la Figura 11.

	Ig de control 3 mpk	TF2053 3 mpk	
Día 14	51,3	28,9	****
Día 28	63,6	11,6	****
Día 42	47,2	9,3	****
Día 53	81,9	9,4	****

- 5 Tabla 30: Porcentaje medio de linfocitos CD4+ humanos de CD45+/CD3+ humanos en sangre total. **** $p < 0,0001$. Los datos también se muestran en la Figura 12.

	Ig de control 3 mpk	TF2053 3 mpk	
Día 14	44,4	66,0	****
Día 28	35,5	87,6	****
Día 42	23,9	74,6	****
Día 53	16,1	72,1	****

Tabla 31: Porcentaje medio de CD8+ humanos de linfocitos CD45+/CD3+ humanos de sangre total. **** $p < 0,0001$. Los datos también se muestran en la Figura 13.

10

	Ig de control 3 mpk	TF2053 3 mpk	
Día 14	44,4	66,0	
Día 28	35,5	87,6	****
Día 42	23,9	74,6	****
Día 53	16,1	72,1	****

Tabla 32: Porcentaje medio de células anérgicas (PD1+KLRG1-CD57-) de linfocitos sanguíneos CD8+/CD3+/CD45+ humanos. **** $p < 0,0001$. Los datos también se muestran en la Figura 14.

	Ig de control 3 mpk	TF2053 3 mpk	
Día 14	30,4	43,7	**
Día 28	41,7	43,5	
Día 42	33,8	45,2	**
Día 53	31,9	44,5	**

- 15 Tabla 33: Porcentaje medio de células agotadas (PD1+KLRG1+CD57-) de linfocitos

sanguíneos CD8+/CD3+/CD45+ humanos. ** $p < 0,01$. Los datos también se muestran en la Figura 15.

	Ig de control 3 mpk	TF2053 3 mpk	
Día 14	13,6	1,0	*
Día 28	0,5	4,2	****
Día 42	1,0	5,7	****
Día 53	0,7	9,0	**

Tabla 34: Porcentaje medio de células senescentes (PD1-KLRG1+CD57+) de linfocitos sanguíneos CD8+/CD3+/CD45+ humanos. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. **** $p < 0,0001$. Estadística: prueba T no apareada de 2 colas entre grupos en cada punto temporal. Los datos también se muestran en la Figura 16.

Conclusión:

El tratamiento de ratones NSG con 3 mg/kg de TF2053 un día antes de la transferencia de 10^7 PBMC humanas proporcionó una protección significativa frente a la GVHD. Mejoró la supervivencia y se redujo la pérdida de peso corporal. Además, se redujo el aumento de peso del hígado y el bazo. Las citocinas inflamatorias humanas circulantes y el injerto de células CD45 humanas fueron significativamente mayores en el día 14, pero significativamente menores en el TF2053 en todos los puntos temporales posteriores. El TF2053 también alteró la proporción de CD4 a CD8, favoreciendo a las células CD8+, y aumentó el porcentaje de estas células CD8+ agotadas y senescentes a lo largo del tiempo, mientras que redujo el porcentaje anérgico. En resumen, se confirmó la hipótesis de que el agonismo del TNFR2 podría proporcionar un beneficio en el modelo in vivo humanizado de NSG-GVHD mediante efectos en los linfocitos T efectores en ausencia de expansión de linfocitos T reguladores.

Referencias:

- Pino, S., et al., *Development of novel major histocompatibility complex class I and class II-deficient NOD-SCID IL2R gamma chain knockout mice for modeling human xenogeneic graft-versus-host disease*. Methods Mol Biol, 2010. **602**: p. 105-17.
- Brehm, M.A., et al., *Lack of acute xenogeneic graft- versus-host disease, but retention of T-cell function following engraftment of human peripheral blood mononuclear cells in NSG mice deficient in MHC class I and II expression*. Faseb j, 2019. **33**(3): p. 3137-3151.

3. Ban, L., et al., *Selective death of autoreactive T cells in human diabetes by TNF or TNF receptor 2 agonism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(36): p. 13644-9.
4. Punit, S., et al., *Tumor Necrosis Factor Receptor 2 Restricts the Pathogenicity of CD8(+) T Cells in Mice With Colitis*. Gastroenterology, 2015. **149**(4): p. 993-1005.e2.

Tabla 35 LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ	Descripción	Secuencia
1	GBT-0854 VL CDR-L1 GBT-1765 VL CDR-L1 GBT-2053 VL CDR-L1	KASQNVGTAVA
2	GBT-0854 VL CDR-L2	SASNRYT
3	GBT-0854 VL CDR-L3 GBT-1765 VL CDR-L3 GBT-2053 VL CDR-L3	QQYSSYPLT
4	GBT-0854 VL	DIVMTQSQKF MSTTVGDRVS ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASNRYTGVPD RFTGSGSGTD FTLTISNMQS EDLADYFCQQ YSSYPLTFGG GTKLEIK
5	Dominio constante de cadena ligera de HuKappa	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC
6	GBT-0854 LC	DIVMTQSQKF MSTTVGDRVS ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASNRYTGVPD RFTGSGSGTD FTLTISNMQS EDLADYFCQQ YSSYPLTFGG GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
7	GBT-1765 VL CDR-L2 GBT-2053 VL CDR-L2	AASTLQS
8	GBT-1765 VL	DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKAPKLLIYA ASTLQSGVPS RFSGSGSGTE FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSSYPLTFGG GTKVEIK
9	GBT-1765 LC GBT-2053 LC	DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKAPKLLIYA ASTLQSGVPS RFSGSGSGTE FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSSYPLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGvT ASVVCLLNNT YPREAKVQWK VDNLQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSLSTLT TLSKADYEKH KVVACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC
10	GBT-0854 VH CDR-H1 GBT-1765 VH CDR-H1 GBT-2053 VH CDR-H1	GFSFPSSGVD
11	GBT-0854 VH CDR-H2	VTWGVGSTHY NSALKS
12	GBT-0854 VH CDR-H3 GBT-1765 VH CDR-H3 GBT-2053 VH CDR-H3	GEWDEGFVY
13	GBT-0854 VH	QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSFP SSGVDWVRQS

		PGKGLEWLGV TWGVGSTHYN SALKSRLSIS KDNSKSQVFL KMNSLQTEDT AIYYCASGEW DEGFVYWGQG TLVTVSA
14	IgG ₂ CH1	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV
15	IgG ₂ bisagra	ERKCCVECPPCP
16	IgG ₂ CH2	APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVAVSHEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPSS IEKTISKTK
17	IgG ₂ CH3	GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
18	Cadena Fc de HuIgG2 función efectora nula bisagra en bastardilla	ERKCCVECP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVAVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKTK KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFCSCVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
19	GBT-0854 HC	QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSFP SSGVDWVRQS PGKGLEWLGV TWGVGSTHYN SALKSRLSIS KDNSKSQVFL KMNSLQTEDT AIYYCASGEW DEGFVYWGQG TLVTVSAAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVP SNFGTQTYTC NVDHKPSNTK VDKTVERKCC VECPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV AVSHEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPMLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
20	GBT-1765 VH CDR-H2 GBT-2053 VH CDR-H2	VTWGVGSTHY NQKFQG
21	GBT-1765 VH	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKVSGFSFP SSGVDWVRQA PGQGLEWLGV TWGVGSTHYN QKFQGRVTIT KDTSKSTVYM ELSSLRSEDV AVYYCASGEW DEGFVYWGQG TLVTVSS
22	GBT-1765 HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKVSGFSFPSSGVDWVRQA PGQGLEWLGV TWGVGSTHYNQKFQGRVTITKDTSKSTVYM ELSSLRSEDV AVYYCASGEW DEGFVYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
23	IgG ₁ CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC
24	IgG ₁ Hinge	DKTHTCPPCP
25	IgG ₁ CH2	APEAAAPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF

	mutaciones efectoras en negrita y subrayado	NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAK
26	IgG ₁ CH3	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
27	Ligador	<u>GGGGS</u>
28	IgG ₁ CH1 y ligador	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC <u>GGGGS</u>
29	GBT-2053 V _H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGFSFSSGVDWVRQAPGQGL EWLGVTWVGSTHYNQKFQGRVTITKDTSKSTVYMELSSLRSED AVYYCASGEWDEGFVYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC <u>GGGGS</u> QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGFSFSSGVDWVRQAPGQGL EWLGVTWVGSTHYNQKFQGRVTITKDTSKSTVYMELSSLRSED AVYYCASGEWDEGFVYWGQGLTVTVSS
30	GBT-2053 dual Fab HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGFSFSSGVDWVRQAPGQGL EWLGVTWVGSTHYNQKFQGRVTITKDTSKSTVYMELSSLRSED AVYYCASGEWDEGFVYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC <u>GGGGS</u> QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGFSFSSGVDWVRQA PGQGLEWLGVTWVGSTHYNQKFQGRVTITKDTSKSTVYMELSSL RSED TAVYYCASGEWDEGFVYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
31	ADN GBT-1765 LC GBT-2053 LC	GATATTCTAGCTGACCCAGAGCCCATCCTTCTCAGCGCCTCCGTG GGGGATAGAGTGACCATACATGTAAGGCCTCACAGAATGTAGGG ACTGCCGTCGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAGGCACCAAAG CTCCTGATTTATGCCGCTTCCACTCTGCAGAGTGGTGTCCCCAGC AGATTCTCAGGTTCTGGCTCTGGAACGGAATTCACCTGACCATC TCTTCTCTGCAACCCGAAGACTTTGCTACCTACTATTGTCAACAG TATAGCTCATAACCACTGACCTTCGGTGGAGGAACGAAAGTTGAG ATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTG GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACG CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGT
32	ADN	CAGGTTCTAGCTTGTGCAAAGCGGCGCAGAGGTCAAGAAGCCAGGG

	GBT-1765 HC	GCCTCCGTCAAGGTGTCCTGTAAAGTCTCTGGCTTTTCCTTCCCA TCCTCTGGGGTGGACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGCAAGGGCTC GAGTGGTTGGGCGTTACATGGGGAGTGGGCTCCACCCACTACAAT CAAAAGTTCCAGGGCCGTGTTACAATCACCAAAGATACCTCTAAA AGCACTGTGTACATGGAGCTGTTCATCATTGAGGTCCGAAGATACC GCCGTTTATTACTGTGCATCAGGGGAGTGGGACGAGGGCTTTGTT TATTGGGGGCAGGGAACCTTGGAACAGTCTCAAGCGCGTCGACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACC TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTCCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA TGCCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCTGGGGCACCCTCAGTC TTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCCGG ACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGAAAA
33	ADN GBT-2053 dual Fab HC	CAAGTCCAGCTTGTGCAGAGCGGTGCTGAGGTTAAAAAGCCTGGG GCAAGTGTCAAAGTCAGCTGTAAAGTCAGCGGTTTTAGCTTTCCG TCCTCAGGCGTGGACTGGGTGAGACAGGCCCCCTGGTCAAGGCCTC GAATGGCTCGGTGTGACATGGGGTGTGGGCTCCACCCATTACAAT CAGAAATTTTCAGGGAAGAGTTACAATCACGAAGGACACTAGTAAA TCAACAGTGTACATGGAGTTGAGTAGCCTTCGCAGCGAGGACACG GCCGTCTACTACTGCGCCAGTGGAGAGTGGGACGAGGGTTTTGTA TATTGGGGACAGGGAACCTCTCGTGACTGTGAGTTCCGCTCGACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACC TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTCCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGGCGGTGGCGGGTCC CAGGTTTCAGCTTGTGCAAAGCGGCGCAGAGGTCAAGAAAGCCAGGG GCCTCCGTCAAGGTGTCCTGTAAAGTCTCTGGCTTTTCCTTCCCA TCCTCTGGGGTGGACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGCAAGGGCTC GAGTGGTTGGGCGTTACATGGGGAGTGGGCTCCACCCACTACAAT CAAAAGTTCCAGGGCCGTGTTACAATCACCAAAGATACCTCTAAA AGCACTGTGTACATGGAGCTGTTCATCATTGAGGTCCGAAGATACC

		GCCGTTTATTACTGTGCATCAGGGGAGTGGGACGAGGGCTTTGTT TATTGGGGGCAGGGAACCTTGGTAACAGTCTCAAGCGCGTCGACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACC TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTCCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA TGCCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCTGGGGCACCCTCAGTC TTCCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCCGG ACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTATAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGAAAA
34	TNFR2 humano	MAPVAVWAALAVGLELWAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREY YDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSCEDSTYTQLWNWV PECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTRPGWYCALSKQEGCR LCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCCKPCAPGTFSTNTTSSTDICR PHQICNVVAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQ HTQPTPEPSTAPSTSFLPMGSPSPAEGSTGDFALPVGLIVGVTA LGLLIIGVNVNIMTQVKKKPLCLQREAKVPHLPADKARGTQGPE QQHLLITAPSSSSSSLESSASALDRRAPTRNQPPAPGVEASGAGE ARASTGSSDSSPGHGTQVNVTCIVNVCSSSDHSSQCSSQASSTM GDTDSSPSES PKDEQVPFSKEECAFRSQLETPETLLGSTEEKPLP LGVPDAGMKPS
35	TNFR2 murino	MAPAALWVALVFELQLWATGHTVPAQVVLTPYKPEPGYECQISQE YYDRKAQMCCAACPPGQYVKHFCNKTSDTVCDCEASMYTQVWNQ FRTCLSCSSSCTTDQVEIRACTKQQNRVCACEAGRYCALKTHSGS CRQCMRLSKCGPGFGVASSRAPNGNVLCACAPGTFSDTTSSTDV CRPHRISILAIIPGNASTDAVCAPESPTLSAIPRTLYVSQPEPTR SQPLDQEPGPSQTPSILTSLGSTPIIEQSTKGGISLPIGLIVGV SLGLMLGLVNCIILVQRKKKPSCLQRDAKVPHVPDEKSQDAVGL EQHLLTTAPSSSSSSLESSASAGDRRAPPGHPQARVMAEAQGF QEARASSRISDSSHGSHGTHVNVTCIVNVCSSSDHSSQCSSQASA TVGDPDAKPSASPKDEQVPFSQECCPSQSPCETTETLQSHEKPLP LGVPDMGMKPSQAGWFDQIAVKVA
36	TNFR2 de Cynomolgus	MAPAAVWAALAVGLELWAAGHALPAQVAFTPYAPEPGGTCLREY YDQTAQMCCSKCPPGQHAKVFCTKTSDTVCDSCEDSTYTQLWNWV PECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTRPGWYCALSKQEGCR LCAQLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCCKPCAPGTFSTNTTSSTDICR

		PHQICHVVAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQ HTQPTPAPSTAPGTSFLLPVGPSPPAEGSTGDIVLPVGLIVGVT LGLLIIGVVNCVIMTQVKKKPLCLQRETKVPHLPADKARGAQGPE QQHLLTTVPSSSSSSLESSASALDRRAPTRNQPPAGAEKASGAG EARASTGSSADSSPGGHGTQVNVTCIVNVCSSSDHSSQCSSQASS TMGDTDASPSGSPKDEQVPFSKEESAQRSQLETPETLLGSTEEKP LPLGVDPAGMKPS
37	Cadena Fc de 2053	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSP GK

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a TNFR2, que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), que comprende las secuencias CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de una secuencia VH
5 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, y SEQ ID NO: 29; y las secuencias CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 de una secuencia VL seleccionada del grupo formado por las SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, y SEQ ID NO: 4.
2. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a TNFR2, que comprende
10 una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), que comprende
 - (i) una secuencia CDR-L1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una secuencia CDR-L2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, y una secuencia CDR-L3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, y una secuencia CDR-H1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 10; una
15 secuencia CDR-H2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 20; una secuencia CDR-H3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 12; o
 - (ii) una secuencia CDR-L1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una secuencia CDR-L2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, y una secuencia CDR-L3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, y una secuencia CDR-H1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 10; una
20 secuencia CDR-H2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 11; una secuencia CDR-H3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 12.
3. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende una o ambas de
 - (i) una secuencia marco VH derivada de una secuencia VH de línea germinal
25 humana seleccionada del grupo formado por IGHV1-46, IGHV4-31, IGHV4-30-4 e IGHV4-4; y
 - (ii) una secuencia marco VL derivada de una secuencia VL de línea germinal humana seleccionada del grupo formado por IGKV1-9, IGKV1-33, IGKV1-27, IGKV1-39, IGKV1-9, IGKV1-1 e IGKV1-11.
- 30 4. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 4, y en donde la VH comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 13.
- 35 5. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que

comprende la secuencia VH de la SEQ ID NO: 21, y la VL de la SEQ ID NO: 8.

6. Un anticuerpo que comprende una o ambas de una secuencia VH codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA-127528 y una secuencia VH codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el
 5 número de acceso ATCC PTA-127529; y una secuencia VL codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA-127531.
7. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además un dominio Fc, en donde el dominio Fc es el dominio Fc de una IgA, IgD, IgE, IgM o IgG.
- 10 8. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además una cadena pesada (HC) que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 22.
9. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además una cadena ligera (LC) que comprende una secuencia de acuerdo
 15 con la SEQ ID NO: 9.
10. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende un primer Fab, un segundo Fab, un tercer Fab, y un cuarto Fab en donde el primer Fab, el segundo Fab, el tercer Fab, y el cuarto Fab comprenden cada uno una secuencia CDR-L1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una secuencia CDR-L2 de acuerdo
 20 con la SEQ ID NO: 7, y una secuencia CDR-L3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, y una secuencia CDR-H1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 10; una secuencia CDR-H2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 20; una secuencia CDR-H3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 12.
11. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el primer Fab, el
 25 segundo Fab, el tercer Fab y el cuarto Fab comprenden cada uno una VH con una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 21 y una VL con una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 8.
12. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en donde el N' terminal del primer Fab está conectado al C' terminal del tercer Fab mediante un
 30 primer ligador, y el N' terminal del segundo Fab está conectado al C' terminal del cuarto Fab mediante un segundo ligador, y en donde, opcionalmente, uno o ambos del primer ligador y del segundo ligador comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 27.
13. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que
 35 comprende una cadena pesada (HC) que comprende una secuencia de acuerdo con la

SEQ ID NO: 30, y una cadena ligera (LC), que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 9.

14. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que comprende una secuencia de cadena pesada (HC) codificada por una secuencia de
5 ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 33, y una secuencia de cadena ligera (LC) codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 31.

15. Un anticuerpo que comprende una secuencia HC codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA-127530 y una secuencia LC codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número
10 de acceso ATCC PTA-127532.

16. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el anticuerpo se caracteriza por uno o más seleccionados del grupo que consiste en:

- (i) una EC_{50} inferior a 5 μ M en un ensayo de potencia del TNFR2 humano en células reporteras Jurkat;
- 15 (ii) una EC_{50} inferior a 10 μ M en un ensayo de potencia del TNFR2 humano en monocitos de sangre periférica humana;
- (iii) una EC_{50} inferior a 5 μ M en un ensayo de potencia del TNFR2 humano en células reporteras Jurkat;
- (iv) una EC_{50} inferior a 2 mg/ml para la regulación hacia arriba de ICAM-1 en la
20 población de linfocitos T primarias que expresan TNFR2 humano de monocitos de sangre periférica humana;
- (v) una EC_{50} inferior a 1 mg/ml para la regulación hacia arriba de ICAM-1 en la población de linfocitos T primarias que expresan TNFR2 humano de monocitos de sangre periférica humana; y
- 25 (vi) una afinidad KD por el TNFR2 humano inferior a 1 nM.

17. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, para su uso como medicamento.

18. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el uso es para el tratamiento de uno o más seleccionados del grupo que consiste en artritis reumatoide
30 (RA), espondilitis anquilosante (AS), enfermedad de Chron (CD), colitis ulcerosa (UC), enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), trasplante, psoriasis (PSO), artritis psoriásica (PSA), dermatitis atópica (AD), vitiligo, alopecia areata (AA), diabetes tipo 1 (T1D), esclerosis múltiple (MS), enfermedad del intestino irritable (IBD), hepatitis autoinmune y lupus eritematoso sistémico (SLE).

35 19. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente

eficaz del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18 y un portador farmacéuticamente aceptable.

20. Un método para tratar una afección médica, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la afección se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide (RA), espondilitis anquilosante (AS), enfermedad de Chron (CD), colitis ulcerosa (UC), enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), trasplante, psoriasis (PSO), artritis psoriásica (APS), dermatitis atópica (AD), vitiligo, alopecia areata (AA), diabetes tipo 1 (T1D), esclerosis múltiple (MS), enfermedad del intestino irritable (IBD), hepatitis autoinmune y lupus eritematoso sistémico (SLE).

22. Un polinucleótido aislado, que comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18.

23. Un polinucleótido aislado que codifica una HC y una LC, o ambas, de un anticuerpo que se une a TNFR2, en donde dicho ácido nucleico comprende uno o más seleccionados del grupo que consiste en la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 31, la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 32, la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 33.

24. Un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo aislado que se une específicamente a TNFR2, que comprende una secuencia de cadena pesada (HC) codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 33, y una secuencia de cadena ligera (LC) codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 31.

25. Un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo aislado que comprende una secuencia HC codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA-127530 y una secuencia LC codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso ATCC PTA-127532.

26. Un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-25.

27. Una célula huésped aislada que comprende el polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-25, o el vector de acuerdo con la reivindicación 26.

28. Un método de producción de un anticuerpo aislado, que comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 27 en condiciones que den lugar a la

producción del anticuerpo, y recuperar el anticuerpo.

RESUMEN

La presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen a TNFR2, así como usos de los anticuerpos y métodos asociados. La divulgación también proporciona procesos para fabricar, preparar y producir anticuerpos que se unen a TNFR2. Los anticuerpos de la divulgación son útiles en uno o más de diagnóstico, profilaxis o tratamiento de trastornos o condiciones mediadas por o asociadas con la actividad de TNFR2.