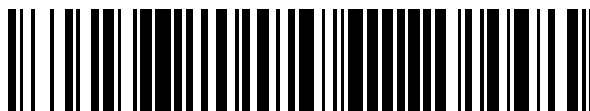


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 887**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2008** **E 12195976 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014** **EP 2594590**

54 Título: **Método para producir moléculas de unión al receptor OX40 humano**

30 Prioridad:

14.12.2007 US 13947 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.01.2015

73 Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (50.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US y
PFIZER INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

MIN, JING;
WU, YANLI;
FINN, RORY FRANCIS;
THIELE, BARRETT RICHARD;
LIAO, WEI;
GLADUE, RONALD PAUL;
RAJPAL, ARVIND;
PARADIS, TIMOTHY JOSEPH;
BRAMS, PETER;
DEVAUX, BRIGITTE;
WU, YI;
TOY, KRISTOPHER;
LEBLANC, HEIDI N. y
HUANG, HAICHUN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 526 887 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para producir moléculas de unión al receptor OX40 humano

Antecedentes

La presente descripción se refiere a anticuerpos, y en particular a anticuerpos que se unen al receptor OX40.

- 5 La estimulación de la función de las células T anti-tumorales representa una aproximación potente y nueva para el tratamiento del cáncer. Los componentes cruciales implicados en la generación de una respuesta eficaz de células T anti-tumorales incluyen la estimulación de la actividad de las células T auxiliares CD4+ para favorecer la generación de células T citolíticas anti-tumorales, y proporcionar señales de supervivencia para las células T efectoras y de memoria. Un receptor clave que se ha demostrado que actúa como mediador en estas respuestas es el receptor
- 10 OX40. Sugamura, K., Ishii, N., Weinberg, A. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nature Rev. Imm.* 4: 420-431 (2004); Hori, T. Roles of OX40 in the pathogenesis and control of diseases. *Intr. J. Hematology*. 83: 17-22 (2006).

- El receptor OX40 (OX40R) (también conocido como CD134, TNFRSF4, ACT-4, ACT35, y TXGP1L) es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF. Se ha descubierto que el OX40R se expresa en las células T CD4+
- 15 activadas. Se ha demostrado que hay un número elevado de células T OX40R+ en tumores (linfocitos infiltrantes de tumores) y en los nódulos linfáticos de drenaje de pacientes de cáncer (Vetto, J.T. et al. 1997. Presence of the T-cell activation marker OX-40 on tumor infiltrating lymphocytes and draining lymph nodes cells from patients with melanoma and head and neck cancers. *Am. J. Surg.* 174: 258-265; Weinberg, A. D. et al. Engagement of the OX-40 receptor in vivo enhances antitumor immunity. *J. Immunol.* 164: 2160-69 (2000); Petty, J.K., et al. Survival in human
- 20 colorectal cancer correlates with expression of the T-cell costimulatory molecule OX-40 (CD134). *Am. J. Surg.* 183: 512-518 (2002)). Se demostró en los modelos de tumores en ratones que la activación del OX40R *in vivo* durante la sensibilización de los tumores retrasó y previno significativamente la aparición de los tumores en comparación con los ratones tratados con el control (Weinberg et al., 2000). Por lo tanto, se ha considerado estimular la respuesta inmunitaria de un mamífero hacia un antígeno activando el OX40R por medio del uso de un agente de unión a
- 25 OX40R (documento WO 99/42585; Weinberg et al., 2000).

Sumario

- La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente descripción proporciona moléculas de unión aisladas que se unen al OX40R humano, que incluyen anticuerpos hacia OX40R, fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos hacia OX40R, y derivados de los anticuerpos hacia OX40R. En ciertas realizaciones, la molécula
- 30 de unión se une al OX40R humano con una K_D de 1×10^{-7} M o menos, y tiene actividad agonista sobre el OX40R humano. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de unión es un anticuerpo monoclonal humano que se une de manera específica al OX40R humano con una K_D de 100 nM o menos.

- La presente descripción también proporciona una composición que comprende una o más de las moléculas de unión y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la molécula de unión es un anticuerpo
- 35 monoclonal hacia OX40R humano o un fragmento de unión al antígeno del mismo. La composición puede comprender además agentes farmacéuticos adicionales, tales como agentes quimioterapéuticos, agentes inmunoterapéuticos, y agentes terapéuticos hormonales.

- La presente descripción proporciona además métodos terapéuticos y de diagnóstico mediante el uso de las moléculas de unión. En ciertas realizaciones, la descripción proporciona un método para tratar o prevenir el cáncer
- 40 en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión o una composición que comprende una molécula de unión. En algunas otras realizaciones, la descripción proporciona un método para estimular una respuesta inmunitaria en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión o una composición que comprende una molécula de unión. En ciertas realizaciones particulares, la molécula de unión usada en los métodos es un
- 45 anticuerpo monoclonal hacia OX40R humano o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

- La presente descripción proporciona además moléculas de ácido nucleico que codifican una secuencia de aminoácidos de una molécula de unión, vectores que comprenden tales ácidos nucleicos, células hospedadoras que comprenden los vectores, y métodos para preparar las moléculas de unión.

- La descripción también proporciona otros aspectos, que serán evidentes a partir de la descripción completa, lo que
- 50 incluye las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1a y 1b son gráficos que muestran que el anticuerpo 11D4 se une de manera específica al OX40R;

La Figura 2 es un gráfico que muestra el efecto del anticuerpo entrecruzado 11D4 sobre la actividad de luciferasa estimulada por OX40R;

La Figura 3 es un gráfico que muestra el efecto del anticuerpo 11D4 sobre la producción de IL-2 por células T sensibilizadas con aloantígeno;

La Figura 4 es un gráfico que muestra el efecto del anticuerpo 11D4 sobre la producción de IL-2 inducida por anti-CD3 por células T primarias;

- 5 La Figura 5 es un gráfico que muestra el efecto del anticuerpo 11D4 sobre la producción de IL-2 inducida por anti-CD3 por células T primarias de cynomolgus;

La Figura 6 muestra las curvas de unión de saturación con anticuerpo 11D4 mediante el uso de PBMCs de cynomolgus de 14 donantes estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28;

- 10 La Figura 7 muestra las curvas de unión de saturación con anticuerpo 11D4 mediante el uso de PBMCs humanas de 17 donantes estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28;

La Figura 8 es un gráfico que muestra el efecto del anticuerpo 11D4 sobre el crecimiento del linfoma de células B Raji en ratones SCID;

La Figura 9 es un gráfico que muestra el efecto del anticuerpo 11D4 sobre el crecimiento del linfoma de células B Raji 21 días tras la inyección del tumor;

- 15 La Figura 10 es un gráfico que muestra el efecto de una única inyección de anticuerpo 11D4 sobre el crecimiento del tumor de próstata PC-3 en ratones SCID;

La Figura 11 es un gráfico que muestra el efecto del anticuerpo 11D4 sobre el crecimiento del tumor de próstata PC-3 en ratones SCID 27 días tras la inyección del tumor;

- 20 La Figura 12 es un gráfico que muestra el efecto del anticuerpo 11D4 sobre el crecimiento del carcinoma de colon LOVO en ratones SCID;

La Figura 13 es un gráfico que muestra el efecto del anticuerpo 11D4 sobre el crecimiento del carcinoma de colon LOVO en ratones SCID 25 días tras la inyección del tumor;

La Figura 14 es un gráfico que muestra el efecto del anticuerpo 11D4 sobre el crecimiento del tumor de mama BT474 en ratones SCID; y

- 25 La Figura 15 es un gráfico que muestra el efecto del anticuerpo 11D4 sobre el crecimiento del tumor de mama BT474 en ratones SCID.

Descripción detallada

Definiciones

- 30 El término "agonista" se refiere a una molécula de unión, como se define en la presente memoria, que tras la unión al OX40R, (1) estimula o activa el OX40R, (2) estimula, incrementa, favorece, induce, o prolonga una actividad, función, o presencia del OX40R, o (3) estimula, incrementa, favorece, o induce la expresión del OX40R.

- 35 El término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que está compuesta en general de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, y cada par tiene una cadena "ligera" (L) y una cadena "pesada" (H). Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. En las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de alrededor de 12 o más aminoácidos, y la cadena pesada también incluye una región "D" de alrededor de 3 o más aminoácidos. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente memoria como HCVR o V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la
- 40 cadena pesada está compuesta de tres dominios, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente memoria como LCVR o V_L) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, que incluyen diversas células del sistema inmunitario (p.ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de cada par de cadenas pesada/ligera (V_H y V_L), respectivamente,
- 50 forman el sitio de unión del anticuerpo. La asignación de los aminoácidos a cada región o dominio está de acuerdo con las definiciones de las Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico de Kabat (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342:878-883. El término "anticuerpo" abarca un anticuerpo que es parte de un multímero de anticuerpos (una forma

multimérica de anticuerpos), tales como dímeros, trímeros, o multímeros de orden superior de anticuerpos monoméricos. También abarca un anticuerpo que está enlazado o unido a, o físicamente o funcionalmente asociado de otra manera a, un resto que no es un anticuerpo. Además, el término "anticuerpo" no está limitado por ningún método particular de producción del anticuerpo. Por ejemplo, incluye, entre otros, anticuerpos recombinantes, anticuerpos monoclonales, y anticuerpos policlonales.

La expresión "derivado de anticuerpo" o "derivado" de un anticuerpo se refiere a una molécula que es capaz de unirse al mismo antígeno (p.ej., OX40R) al que se une el anticuerpo, y comprende una secuencia de aminoácidos del anticuerpo unida a una entidad molecular adicional. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo que está contenida en el derivado de anticuerpo puede ser el anticuerpo de longitud completa, o puede ser cualquier porción o porciones de un anticuerpo de longitud completa. La entidad molecular adicional puede ser una molécula química o biológica. Los ejemplos de entidades moleculares adicionales incluyen grupos químicos, aminoácidos, péptidos, proteínas (tales como enzimas, anticuerpos), y compuestos químicos. La entidad molecular adicional puede tener cualquier utilidad, tal como para el uso como un agente de detección, etiqueta, marcador, agente farmacéutico o terapéutico. La secuencia de aminoácidos de un anticuerpo se puede unir o enlazar a la entidad adicional mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera. La expresión "derivado de anticuerpo" también abarca los anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y moléculas que derivan de modificaciones de las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo hacia OX40R, tales como sustituciones, adiciones e inserciones de aminoácidos conservados.

La expresión "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo se refiere a una o más porciones de un anticuerpo de longitud completa que conservan la capacidad de unirse al mismo antígeno (p.ej., OX40R) al que se une el anticuerpo. La expresión "fragmento de unión al antígeno" también abarca la porción de un anticuerpo que es parte de una molécula mayor formada mediante asociación covalente o no covalente de la porción del anticuerpo con una o más entidades moleculares adicionales. Los ejemplos de entidades moleculares adicionales incluyen aminoácidos, péptidos, o proteínas, tales como la región central de estreptavidina, que se pueden usar para producir una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov et al., (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101), un residuo de cisteína, un péptido marcador, o una etiqueta de polihistidina C-terminal, que se puede usar para producir moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov et al., (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058).

La expresión "molécula de unión" abarca un (1) anticuerpo, (2) fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo, y (3) derivado de un anticuerpo, cada uno como se define en la presente memoria.

La expresión "se une a OX40R" o "unión a OX40R" se refiere a la unión de una molécula de unión, como se define en la presente memoria, al OX40R en un ensayo *in vitro*, tal como un ensayo BIAcore. La unión significa una afinidad de unión (K_D) de 1×10^{-6} M o menos.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende secuencias de aminoácidos derivadas de dos o más anticuerpos diferentes. Los dos o más anticuerpos diferentes pueden ser de la misma especie o de dos o más especies diferentes.

La expresión "sustitución conservativa de aminoácidos" se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido, en la que los grupos R de las cadenas laterales de los dos residuos de aminoácidos tienen propiedades químicas similares (p.ej., carga o hidrofobicidad). Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicocola, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales hidroxialifáticas: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amidas: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico; y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de las sustituciones conservativas de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato, y asparagina-glutamina.

El término "epítipo" se refiere a la parte de un antígeno que es capaz de producir una unión específica a un anticuerpo, o receptor de células T, o de interaccionar de otra manera con una molécula. "Epítipo" también se conoce en la técnica como "determinante antigénico". Un epítipo consiste en general en agrupamientos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o carbohidratos o cadenas laterales de carbohidratos, y en general tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características específicas de cargas. Un epítipo puede ser "lineal" o "conformacional". Una vez que se determina un epítipo deseado en un antígeno, se pueden generar anticuerpos hacia ese epítipo, p.ej., mediante el uso de las técnicas descritas en la presente memoria. La generación y caracterización de anticuerpos también puede proporcionar información sobre los epítipos deseables. A partir de esta información, es posible cribar de manera competitiva anticuerpos en función de la unión al mismo epítipo. Una aproximación para conseguir esto es llevar a cabo estudios de competición cruzada para hallar anticuerpos que se unen de manera competitiva entre sí, es decir, los anticuerpos compiten por la unión al antígeno. Un proceso de alto rendimiento para "clasificar" anticuerpos basándose en su competición cruzada se describe en la publicación PCT N° WO 03/48731.

La expresión "línea germinal" se refiere a las secuencias de nucleótidos de los genes de anticuerpos y de los

segmentos génicos tal como pasan de los padres a la descendencia por medio de las células germinales. La secuencia de la línea germinal se distingue de las secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos en las células B maduras que se han alterado por la recombinación y los eventos de hipermutación durante el transcurso de la maduración de las células B.

5 La expresión "célula hospedadora" se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión. La expresión abarca no solamente la célula individual particular, sino también la progenie de tal célula. Debido a que se pueden dar ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, tal progenie puede no ser idéntica a la célula original, pero todavía se incluye dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora". La expresión "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo que consiste en secuencias de
10 aminoácidos de secuencias de inmunoglobulinas humanas solamente. Un anticuerpo humano puede contener cadenas de carbohidratos murinas si se produce en un ratón, en una célula de ratón o en un hibridoma derivado de una célula de ratón. Se pueden preparar anticuerpos humanos de una diversidad de maneras conocidas en la técnica.

15 La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que contiene residuos de aminoácidos derivados de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado puede contener algunas o todas las CDRs de un anticuerpo animal no humano, mientras la región estructural y las regiones constantes del anticuerpo contienen residuos de aminoácidos derivados de secuencias de anticuerpos humanos.

El término "mamífero" se refiere a cualquier especie animal de la clase Mammalia. Los ejemplos de mamíferos incluyen: seres humanos; animales de laboratorio tales como ratas, ratones, simios y conejillos de Indias; animales
20 domésticos tales como gatos, perros, conejos, ganado bovino, ovejas, cabras, caballos, y cerdos; y animales salvajes capturados tales como leones, tigres, elefantes, y similares.

La expresión "ácido nucleico aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico de origen genómico, cADN, o sintético, o una combinación de las mismas, que está separada de otras moléculas de ácido nucleico presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Por ejemplo, con respecto al ADN genómico, el término "aislado" incluye las
25 moléculas de ácido nucleico que están separadas del cromosoma con el que el ADN genómico está asociado de manera natural. Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" está exento de las secuencias que flanquean de manera natural al ácido nucleico (es decir, las secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico de interés) en el ADN genómico del organismo del cual procede el ácido nucleico.

La expresión "anticuerpo aislado" o "molécula de unión aislada" se refiere a un anticuerpo o una molécula de unión que: (1) no está asociada a componentes asociados de manera natural que la acompañan en su estado nativo; (2) está exenta de otras proteínas de la misma especie; (3) es expresada por una célula de una especie diferente; o (4) no se da en la naturaleza. Los ejemplos de anticuerpos aislados incluyen un anticuerpo hacia OX40R que se ha purificado por afinidad mediante el uso de OX40R, un anticuerpo hacia OX40R que se ha generado mediante
30 hibridomas u otra línea celular *in vitro*, y un anticuerpo hacia OX40R humano derivado de un animal transgénico.

El término " K_D " se refiere a la constante de disociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular, y se usa para describir la afinidad de unión entre un ligando (tal como un anticuerpo) y una proteína (tal como el OX40R). Cuanto menor sea la constante de disociación en equilibrio, más fuertemente estará unido el ligando, o mayor será la afinidad entre el ligando y la proteína. Una K_D se puede medir mediante resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo mediante el uso del sistema BIACORE™. Se describe un procedimiento de
40 ensayo mediante el uso del sistema BIACORE™ (ensayo BIAcore) en la sección de Ejemplos de esta descripción.

La expresión "velocidad de disociación" o " k_d " se refiere a la constante de la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Una constante de la velocidad de disociación se puede medir mediante resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo mediante el uso del BIACORE™.

La expresión "anticuerpo hacia OX40R" se refiere a un anticuerpo, como se define en la presente memoria, capaz de
45 unirse al OX40R humano.

Las expresiones "receptor OX40" y "OX40R" se usan de manera intercambiable en la presente solicitud, e incluyen el OX40R humano, así como las variantes, isoformas, y homólogos de especie del mismo. Por lo tanto, las moléculas de unión humanas descritas en la presente memoria también se pueden unir, en ciertos casos, al OX40R de especies distintas de la humana. En otros casos, las moléculas de unión pueden ser completamente específicas
50 para el OX40R humano, y pueden no exhibir reactividad cruzada de especie o de otro tipo.

La expresión "se une de manera específica al OX40R humano", en referencia a la interacción de una molécula de unión, p.ej. un anticuerpo, con su pareja de unión, p.ej. un antígeno, significa que la K_D de una molécula de unión para la unión a CD40, CD137, o CD271 es mayor de 100 veces la K_D para su unión al OX40R humano, tal como se determina en un ensayo *in vitro*.

55 El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otra molécula de ácido nucleico a una célula hospedadora. Los ejemplos de vectores incluyen plásmidos, vectores virales, ADN desnudo o vectores de expresión de ARN, cósmidos o vectores de fagos. Algunos vectores pueden llevar a cabo una replicación

autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (p.ej., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamíferos). Algunos vectores se pueden integrar en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y por lo tanto se replican junto con el genoma del hospedador (p.ej., vectores no episómicos de mamíferos). Algunos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están unidos de forma operable, y por lo tanto se pueden denominar "vectores de expresión".

Tal como se usa en la presente memoria, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase *Immunology - A Synthesis* (2ª Edición, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, MA (1991)).

Moléculas de unión que se unen al OX40R humano

La presente descripción proporciona moléculas de unión aisladas que se unen al OX40R humano, que incluyen anticuerpos hacia OX40R, fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos hacia OX40R, y derivados de los anticuerpos hacia OX40R. Las moléculas de unión se caracterizan por al menos una de las propiedades funcionales siguientes: (a) se unen al OX40R humano con una K_D de 1×10^{-6} M o menos; (b) tienen actividad agonista sobre el OX40R humano; (c) no se unen al receptor CD40 a una concentración de hasta 500 nM; (d) no se unen al receptor CD137 a concentraciones de hasta 500 nM; (e) no se unen al receptor CD271 a concentraciones de hasta 500 nM; (f) son capaces de estimular la producción de IL-2 por las células T humanas aisladas; (g) son capaces de estimular una respuesta inmunitaria; (h) son capaces de inhibir el crecimiento de células tumorales; y (i) tienen un efecto terapéutico sobre un cáncer. En ciertas realizaciones, la molécula de unión se une al OX40R humano con una K_D de 1×10^{-7} M o menos, o 1×10^{-8} M o menos, o $5 \times 1 \times 10^{-9}$ M o menos.

Anticuerpos hacia OX40R humanos

En un primer aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo humano que se une al OX40R humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo humano es un anticuerpo monoclonal que se une de manera específica al OX40R humano con una K_D de 100 nM o menos, preferiblemente 10 nM o menos, y tiene actividad agonista sobre el OX40R humano. Un ejemplo de tales anticuerpos humanos es el anticuerpo monoclonal humano 11D4. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) del anticuerpo 11D4 se muestran en SEQ ID N°s: 9 y 7, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) del anticuerpo 11D4 se muestran en SEQ ID N°s: 10 y 8, respectivamente. Los isotipos del anticuerpo 11D4 son IgG2 para la cadena pesada y Kappa para la cadena ligera. Los alotipos del anticuerpo 11D4 son G2(n-) para la cadena pesada y Km3 para la cadena ligera. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera maduras derivan de la traducción conceptual de las secuencias de ADN en las construcciones de expresión. El anticuerpo 11D4 no contiene mutaciones de la región estructural en la cadena pesada o la cadena ligera, pero contiene una mutación en la CDR2 de la cadena pesada.

Otro anticuerpo ilustrativo de la descripción es el anticuerpo monoclonal humano 18D8. La secuencia de aminoácidos de la región V_H y de la región V_L del anticuerpo 18D8 se muestran en SEQ ID N°s: 19 y 20, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y de la cadena ligera se muestran en SEQ ID N°s: 21 y 22, respectivamente.

Dado que 11D4 y 18D8 se unen al OX40R, las secuencias V_H y V_L de cada uno de ellos se pueden "mezclar y acoplar" con otros anticuerpos hacia OX40R para crear anticuerpos adicionales. La unión de tales anticuerpos "mezclados y acoplados" al OX40R se puede ensayar mediante el uso de los ensayos de unión conocidos en la técnica, que incluyen un ensayo descrito en los Ejemplos. En un caso, cuando se mezclan y se acoplan las regiones V_H y V_L , se sustituye una secuencia V_H de un emparejamiento V_H/V_L particular con una secuencia V_H estructuralmente similar. De forma similar, en otro caso se sustituye una secuencia V_L de un emparejamiento V_H/V_L particular con una secuencia V_L estructuralmente similar.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la descripción proporciona un anticuerpo hacia OX40R aislado que comprende: (1) una región variable de la cadena pesada del anticuerpo 11D4 ó 18D8, (2) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°s: 7 ó 19, o (3) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°s: 11 ó 23. En algunas otras realizaciones, la descripción proporciona un anticuerpo hacia OX40R aislado que comprende: (1) una región variable de la cadena ligera del anticuerpo 11D4 ó 18D8, (2) una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°s: 8 ó 20, o (3) una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°s: 12 ó 24.

En otro aspecto, la descripción proporciona anticuerpos que comprenden las CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de la cadena pesada (V_H) y CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena ligera de 11D4 ó 11D8. Las secuencias de aminoácidos de la CDR1 de V_H , CDR2 de V_H , y CDR3 de V_H de 11D4 se muestran en SEQ ID N°s: 1, 2, y 3, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de la CDR1 de V_L , CDR2 de V_L , y CDR3 de V_L del anticuerpo 11D4 se muestran en SEQ ID N°s: 4, 5, y 6, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de la CDR1 de V_H ,

CDR2 de V_H, y CDR3 de V_H del anticuerpo 18D8 se muestran en SEQ ID N°s: 13, 14, y 15, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de la CDR1 de V_L, CDR2 de V_L, y CDR3 de V_L del anticuerpo 18D8 se muestran en SEQ ID N°s: 16, 17, y 18, respectivamente. Las regiones CDR se definen mediante el uso del sistema de Kabat (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Sociales de EE.UU., publicación del NIH N° 91-3242).

Dado que 11D4 y 18D8 se unen al OX40R humano y que la especificidad de unión al antígeno se proporciona principalmente por las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H y las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de V_L se pueden "mezclar y acoplar" para crear anticuerpos hacia OX40R adicionales. Por ejemplo, las CDRs de diferentes anticuerpos hacia OX40R se pueden mezclar y acoplar, aunque cada anticuerpo contendrá en general una CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H y una CDR1, CDR2, y CDR3 de V_L. La unión de tales anticuerpos "mezclados y acoplados" al OX40R se puede ensayar mediante el uso de los ensayos de unión descritos anteriormente y en los Ejemplos (p.ej., ELISAs, análisis Biacore). En un caso, cuando se mezclan y acoplan las secuencias de CDR de V_H, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_H particular se sustituye con secuencia(s) de CDR estructuralmente similar(es). De forma similar, cuando se mezclan y acoplan las secuencias de CDR de V_L, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_L particular se sustituye en general con secuencia(s) de CDR estructuralmente similar(es). Será fácilmente evidente para un técnico experto que se pueden crear secuencias V_H y V_L nuevas sustituyendo una o más secuencias de regiones de CDR de V_H y/o V_L con secuencias estructuralmente similares a partir de las secuencias de CDR descritas en la presente memoria.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la descripción proporciona (1) un anticuerpo monoclonal aislado que comprende al menos una CDR seleccionada de CDR1 de V_H, CDR2 de V_H, o CDR3 de V_H del anticuerpo 11D4 ó 18D8. En algunas otras realizaciones, la descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que comprende al menos una CDR seleccionada de CDR1 de V_L, CDR2 de V_L o CDR3 de V_L del anticuerpo 11D4 ó 18D8. En ciertas realizaciones adicionales, la descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que comprende al menos una CDR seleccionada de: una CDR1 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°s: 1 ó 13, o una secuencia que difiere de SEQ ID N°s: 1 ó 3 en 1, 2, 3, o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; una CDR2 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°s: 2 ó 14 o una secuencia que difiere de SEQ ID N°s: 2 ó 14 en 1, 2, 3, o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y una CDR3 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°s: 3 ó 15 o una secuencia que difiere de SEQ ID N°s: 3 ó 15 en 1, 2, 3, o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos.

En ciertas realizaciones adicionales, la descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que comprende al menos una CDR seleccionada de: una CDR1 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°s: 4 ó 16 o una secuencia que difiere de SEQ ID N°s: 4 ó 16 en 1, 2, 3, o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; una CDR2 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°s: 5 ó 17 o una secuencia que difiere de SEQ ID N°s: 5 ó 17 en 1, 2, 3, o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos; y una CDR3 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°s: 6 ó 18 o una secuencia que difiere de SEQ ID N°s: 6 ó 18 en 1, 2, 3, o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos.

En ciertos casos, la lisina C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo hacia OX40R está escindida (Harris R. J., *J. of Chromatography*, 705: 129-134 (1995)). La(s) cadena(s) pesada(s) y/o ligera(s) de los anticuerpos hacia OX40R pueden incluir opcionalmente una secuencia señal.

La clase (p.ej., IgG, IgM, IgE, IgA, o IgD) y la subclase (p.ej., IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) de los anticuerpos hacia OX40R se pueden determinar mediante cualquier método adecuado. En general, la clase y la subclase de un anticuerpo se pueden determinar mediante el uso de anticuerpos que son específicos para una clase y subclase particular de anticuerpo. Tales anticuerpos están disponibles comercialmente. La clase y la subclase se pueden determinar mediante ELISA o transferencia de Western, así como con otras técnicas. De manera alternativa, la clase y la subclase se pueden determinar secuenciando todo o una porción de los dominios constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de diversas clases y subclases de inmunoglobulinas, y determinando la clase y la subclase de los anticuerpos. Los anticuerpos hacia OX40R pueden ser una molécula de IgG, una IgM, una IgE, una IgA, o una IgD. Por ejemplo, los anticuerpos hacia OX40R pueden ser una IgG que es una subclase IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. Así, otro aspecto de la descripción proporciona un método para convertir la clase o la subclase de un anticuerpo hacia OX40R en otra clase o subclase. En algunos casos, una molécula de ácido nucleico que codifica una V_L o V_H que no incluye secuencias que codifican C_L o C_H se aísla mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica. La molécula de ácido nucleico se une después de forma operable a una secuencia de ácido nucleico que codifica una C_L o C_H de una clase o subclase de inmunoglobulina deseada. Esto se puede llevar a cabo mediante el uso de un vector o molécula de ácido nucleico que comprende una cadena C_L o C_H, como se describió anteriormente. Por ejemplo, a un anticuerpo hacia OX40R que era en principio IgM se le puede cambiar la clase a una IgG. Además, el cambio de clase se puede usar para convertir una subclase de IgG en otra, p.ej., de IgG1 a IgG2. Otro método para producir un anticuerpo que comprende un isotipo deseado comprende las etapas de aislar un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo hacia OX40R y un ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo hacia OX40R, aislar la secuencia que codifica la región V_H, ligar la secuencia de V_H a una secuencia que codifica un dominio constante de la cadena pesada del isotipo deseado, expresar la construcción del gen de la cadena ligera y de cadena pesada en una célula, y recoger el anticuerpo hacia OX40R con el isotipo deseado.

Fragmentos de unión al antígeno

En otro aspecto, la presente descripción proporciona fragmentos de unión al antígeno de cualquiera de los anticuerpos hacia OX40R humanos como se describió anteriormente en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el fragmento de unión al antígeno se selecciona de: (1) una cadena ligera de un anticuerpo hacia OX40R; (2) una cadena pesada de un anticuerpo hacia OX40R; (3) una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo hacia OX40R; (4) una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo hacia OX40R; (5) una o más CDRs (dos, tres, cuatro, cinco, o seis CDRs) de un anticuerpo hacia OX40R; o (6) tres CDRs de la cadena ligera y tres CDRs de la cadena pesada de un anticuerpo hacia OX40R. En ciertas realizaciones particulares, la descripción proporciona un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo 11D4 ó 18D8. En algunas otras realizaciones particulares, los fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo hacia OX40R incluyen: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_H1 ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región de la bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_H1 ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio V_H ; (vi) una CDR aislada, y (vii) un anticuerpo de cadena simple (scFv), que es un polipéptido que comprende una región VL de un anticuerpo unida a una región VH de un anticuerpo. Bird et al., (1988) Science 242:423-426 y Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883. Un fragmento de unión al antígeno puede comprender también dos o más fragmentos más cortos, de la misma cadena pesada o de la misma cadena ligera, o de cadenas diferentes. Los fragmentos de unión al antígeno, tales como los fragmentos Fab y $F(ab')_2$, se pueden preparar a partir de anticuerpos completos mediante el uso de técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. También se pueden obtener mediante el uso de técnicas de ADN recombinante, como se describe en la presente memoria.

Derivados de anticuerpos

En ciertos aspectos adicionales, la presente descripción proporciona derivados de cualquiera de los anticuerpos hacia OX40R como se describió anteriormente en la presente memoria.

En un aspecto particular, el derivado de anticuerpo deriva de modificaciones de las secuencias de aminoácidos de 11D4 ó 18D8. Se pueden modificar las secuencias de aminoácidos de cualquier región de las cadenas de anticuerpos, tales como las regiones estructurales, las regiones CDR, o las regiones constantes. Las modificaciones se pueden introducir mediante métodos habituales conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida y la mutagénesis aleatoria mediada por PCR, y pueden comprender aminoácidos naturales y no naturales.

Los tipos de modificaciones incluyen sustituciones, inserciones, delecciones, o combinaciones de las mismas, de uno o más aminoácidos de un anticuerpo hacia OX40R. En ciertas realizaciones, el derivado de anticuerpo comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácidos en las CDRs de la cadena pesada y/o una sustitución de aminoácidos en las CDRs de la cadena ligera. En ciertas realizaciones, un derivado de un anticuerpo hacia OX40R comprende una o más sustituciones de aminoácidos respecto de la secuencia de aminoácidos de la línea germinal del gen humano. En una realización particular, una o más de esas sustituciones de la línea germinal están en la región CDR2 de la cadena pesada. En otra realización particular, las sustituciones de aminoácidos respecto de la línea germinal están en una o más de las mismas posiciones que las sustituciones respecto de la línea germinal en los anticuerpos 11D4 ó 18D8. En otra realización, la sustitución de aminoácidos es el cambio de una o más cisteínas en un anticuerpo por otro residuo, tal como, sin limitación, alanina o serina. La cisteína puede ser una cisteína canónica o no canónica. La sustitución se puede hacer en una CDR o una región estructural de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. Otro tipo de sustitución de aminoácidos es eliminar pares asparagina-glicocola, que forman sitios de desamidación potenciales, alterando uno o ambos residuos. Aún en otras realizaciones, la sustitución de aminoácidos es una sustitución conservativa de aminoácidos. En una realización, el derivado de anticuerpo tiene 1, 2, 3, o 4 sustituciones conservativas de aminoácidos en las regiones CDR de la cadena pesada respecto de las secuencias de aminoácidos de 11D4 ó 18D8.

Otro tipo de modificación de un anticuerpo hacia OX40R es la alteración del patrón de glicosilación original del anticuerpo. El término "alteración" se refiere a la delección de uno o más restos de carbohidratos hallados en el anticuerpo, y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glicosilación de los anticuerpos se da en general con unión en N. La unión en N se refiere a la unión del resto de carbohidrato en la cadena lateral de un residuo de asparagina. La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se lleva a cabo de manera conveniente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos anteriormente descritas (para los sitios de glicosilación con unión en N).

Aún otro tipo de modificación implica la extracción de cualquier resto de carbohidrato presente en el anticuerpo, que se puede llevar a cabo químicamente o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición del anticuerpo a un compuesto, tal como ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayor parte o de todos los carbohidratos excepto el carbohidrato de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), y al mismo tiempo deja el anticuerpo intacto. La desglicosilación química se describe en Sojhr, H. T., y Bahl, O. P., Arch. Biochem. Biophys. 259 (1987) 52-57 y en Edge, A. S., et al. Anal. Biochem. 118 (1981) 131-137. La escisión enzimática de los restos de carbohidrato en los anticuerpos se puede

llevar a cabo mediante el uso de una diversidad de endo- y exo-glicosidasas como describió Thotakura, N. R., y Bahl, O. P., *Meth. Enzymol.* 138 (1987) 350-359.

Los ejemplos de otras modificaciones incluyen acetilación, acilación, amidación, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cistina, formilación, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, y sulfatación.

En un aspecto adicional, se proporciona un derivado de anticuerpo que comprende un anticuerpo hacia OX40R, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, como se describe en la presente memoria, unido a una entidad molecular adicional. Los ejemplos de entidades moleculares adicionales incluyen agentes farmacéuticos, péptidos o proteínas, y agentes de detección o marcadores. Los ejemplos específicos de agentes farmacéuticos que se pueden unir a un anticuerpo hacia OX40R incluyen agentes citotóxicos u otros agentes terapéuticos del cáncer, e isótopos radiactivos. Los ejemplos específicos de péptidos o proteínas que se pueden unir a un anticuerpo hacia OX40R incluyen anticuerpos, que pueden ser el mismo anticuerpo hacia OX40R o un anticuerpo diferente. Los ejemplos específicos de agentes de detección o marcadores que se pueden unir a un anticuerpo hacia OX40R incluyen (1) compuestos fluorescentes, tales como fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamin-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, y sustancias fosforescentes de lantánidos; (2) enzimas, tales como peroxidasa de rábano, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, y glucosa oxidasa; (3) biotina; (4) un epítipo polipeptídico predeterminado reconocido por un indicador secundario, tales como secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión de metales, y etiquetas de epítopos. En una realización particular, el derivado de anticuerpo es un multímero de anticuerpos hacia OX40R, que es una forma multimérica de un anticuerpo hacia OX40R, tal como dímeros de anticuerpos, trímeros, o multímeros de orden superior de anticuerpos monoméricos. Los monómeros individuales en un multímero de anticuerpos pueden ser idénticos o diferentes, es decir, pueden ser multímeros de anticuerpos heteroméricos u homoméricos. Los anticuerpos individuales en un multímero pueden tener especificidades de unión iguales o diferentes. La multimerización de anticuerpos se puede llevar a cabo por medio de la agregación natural de anticuerpos. Por ejemplo, cierto porcentaje de preparaciones de anticuerpos purificados (p.ej., moléculas IgG1 purificadas) forman espontáneamente agregados de proteínas que contienen homodímeros de anticuerpos, y otros multímeros de orden superior de anticuerpos. De manera alternativa, los homodímeros de anticuerpos se pueden formar por medio de métodos de unión química conocidos en la técnica, tal como por medio del uso de agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales. Los entrecruzadores adecuados incluyen los que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos reactivos diferentes separados por un espaciador adecuado (tal como éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, 4-(maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, y S-acetiltioacetato de N-succinimidilo) u homobifuncionales (tal como suberato de disuccinimidilo). Tales entrecruzadores están disponibles comercialmente de Pierce Chemical Company, Rockford, IL. Los anticuerpos se pueden producir también para multimerizar por medio de métodos de ADN recombinante conocidos en la técnica.

En otro aspecto, el derivado de anticuerpo es un anticuerpo quimérico, que comprende una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo hacia OX40R humano descrito anteriormente en la presente memoria. En un ejemplo, se combina una o más CDRs de un anticuerpo hacia OX40R humano con CDRs de un anticuerpo de un animal no humano, tal como ratón o rata. En otro ejemplo, todas las CDRs del anticuerpo quimérico derivan de anticuerpos hacia OX40R humanos. En otro ejemplo, las CDRs de más de un anticuerpo hacia OX40R humano se combinan en un anticuerpo quimérico. Además, un anticuerpo quimérico puede comprender las regiones estructurales derivadas de un anticuerpo hacia OX40R humano y una o más CDRs de uno o más anticuerpos humanos diferentes. Se pueden generar anticuerpos quiméricos mediante el uso de métodos convencionales conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones particulares, el anticuerpo quimérico comprende una, dos, o tres CDRs de la región variable de la cadena pesada o de la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del anticuerpo 11D4 ó 18D8.

Los ejemplos de otros derivados de anticuerpos proporcionados por la presente descripción incluyen anticuerpos de cadena simple, diacuerpos, anticuerpos de un dominio, nanocuerpos, y unicuerpos. Un "anticuerpo de cadena simple" (scFv) consiste en una cadena polipeptídica simple que comprende un dominio V_L unido a un dominio V_H en el que el dominio V_L y el dominio V_H están emparejados para formar una molécula monovalente. Se puede preparar un anticuerpo de cadena simple según el método conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Bird et al., (1988) *Science* 242:423-426 y Huston et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Un "diacuerpo" consiste en dos cadenas, y cada cadena comprende una región variable de la cadena pesada conectada a una región variable de la cadena ligera en la misma cadena polipeptídica conectadas mediante un ligador peptídico corto, en el que las dos regiones de la misma cadena no se emparejan entre sí, sino con los dominios complementarios de la otra cadena para formar una molécula biespecífica. Los métodos para preparar diacuerpos se conocen en la técnica (Véase, p.ej., Holliger P. et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448, y Poljak R. J. et al., (1994) *Structure* 2:1121-1123). Los anticuerpos de un dominio (dAbs) son unidades de unión funcionales pequeñas de anticuerpos, que corresponden a las regiones variables de las cadenas pesadas o ligeras de los anticuerpos. Los anticuerpos de un dominio se expresan en sistemas de células bacterianas, de levadura, y de mamífero. Se conocen en la técnica los detalles adicionales sobre los anticuerpos de un dominio y los métodos de producción de los mismos (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N°s 6.291.158; 6.582.915; 6.593.081; 6.172.197; 6.696.245; las patentes europeas

0368684 y 0616640; los documentos WO05/035572, WO04/101790, WO04/081026, WO04/058821, WO04/003019 y WO03/002609. Los nanocuerpos derivan de las cadenas pesadas de un anticuerpo. Un nanocuerpo comprende en general un único dominio variable y dos dominios constantes (CH2 y CH3) y conserva la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo original. Los nanocuerpos se pueden preparar mediante métodos conocidos en la técnica (Véase, p.ej., la patente de EE.UU. N° 6.765.087, patente de EE.UU. N° 6.838.254, el documento WO 06/079372). Los unicuerpos consisten en una cadena ligera y una cadena pesada de un anticuerpo IgG4. Los unicuerpos se pueden producir mediante la extracción de la región bisagra de los anticuerpos IgG4. Se pueden hallar detalles adicionales sobre los unicuerpos y los métodos para prepararlos en el documento WO2007/059782.

Métodos de producción de las moléculas de unión

- 10 Las moléculas de unión como se describen en la presente memoria se pueden producir mediante métodos conocidos en la técnica, que incluyen la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, p.ej., la técnica de hibridación de células somáticas estándar de Kohler y Milstein (Nature 256: 495, (1975)), así como otras técnicas, tales como transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

Inmunización de animales no humanos

- 15 La descripción también proporciona un método para producir anticuerpos hacia OX40R o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que comprende inmunizar un animal no humano que comprende loci de inmunoglobulinas humanas con un antígeno de OX40R, y aislar el anticuerpo del animal inmunizado o de las células derivadas del animal inmunizado.

- 20 Los ejemplos de animales no humanos adecuados incluyen un animal transgénico o transcromosómico, tales como HuMAb Mouse[®], KM Mouse[®], "ratones TC", y Xenomouse[™]. El HuMAb Mouse[®] (Medarex, Inc.) contiene miniloci de genes de inmunoglobulinas humanas que codifican secuencias de inmunoglobulinas de la cadena pesada (μ y γ) y ligera κ humanas sin reordenar, junto con mutaciones seleccionadas que inactivan los loci de las cadenas μ y κ endógenas (véase p.ej., Lonberg, et al. (1994) Nature 368: 856-859). Por lo tanto, los ratones exhiben una expresión reducida de IgM o κ de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de las cadenas pesada y ligera humanas introducidas experimentan un cambio de clase y una mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG κ humanos de afinidad elevada (Véase, p.ej., Harding, F. y Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546). La preparación y el uso del HuMAb Mouse[®], y las modificaciones genómicas portadas por tales ratones, se conocen bien en la técnica (Véase, p.ej., Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851). Los ratones KM[™] portan un transgén de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana, y se describen con detalle en el documento WO 02/43478. El Xenomouse[™] (Abgenix, Inc.) contiene fragmentos grandes de los loci de inmunoglobulinas humanas y carecen de producción de anticuerpos de ratón. Este modelo animal se conoce bien en la técnica (Véanse, p.ej., las patentes de EE.UU. N°s: 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584; y 6.162.963). Los "ratones TC" también son ratones modificados que portan tanto un transcromosoma de la cadena pesada humana como un transcromosoma de la cadena ligera humana. Tales ratones se describen en Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727.

- El antígeno de OX40R para el uso para inmunizar al animal puede ser OX40R aislado y/o purificado, y es preferiblemente un OX40R humano. En una realización, el antígeno de OX40R es un fragmento del OX40R humano, preferiblemente el dominio extracelular del OX40R. En otra realización, el antígeno de OX40R es un fragmento que comprende al menos un epítipo del OX40R humano. En otra realización, el antígeno de OX40R es una célula que expresa OX40R en su superficie celular, más en particular una célula que sobreexpresa el OX40R en su superficie celular. La inmunización de los animales se puede llevar a cabo mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. (Véase, p.ej., Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1990). Los métodos particulares para inmunizar animales no humanos tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, ganado bovino y caballos se conocen bien en la técnica (Véase, p.ej., Harlow y Lane (1990); pat. de EE.UU. n° 5.994.619). El Ejemplo 1 proporciona un método para inmunizar ratones HuMAb.

Tras la inmunización del animal con un antígeno de OX40R, se pueden obtener anticuerpos y/o células que producen anticuerpos del animal. En una realización, se obtiene suero del animal y se puede obtener una fracción de inmunoglobulinas a partir del suero, o se pueden purificar los anticuerpos hacia OX40R a partir del suero.

- 50 Los anticuerpos hacia OX40R se pueden producir también mediante el uso de células inmortalizadas que producen anticuerpos preparadas a partir de células aisladas del animal inmunizado. Tras la inmunización, se recogen las células B de los nódulos linfáticos y/o esplénicas del animal y se immortalizan mediante medios adecuados. Los métodos para immortalizar células incluyen, pero sin limitación, transfectarlas con oncogenes, infectarlas con un virus oncogénico y cultivarlas en condiciones que seleccionan las células inmortalizadas, someterlas a compuestos carcinógenos o mutágenos, fusionarlas con una célula inmortalizada, p.ej., una célula de mieloma, e inactivarlas con un gen inhibidor de tumores (Véase, p.ej., Harlow y Lane, anteriormente mencionados). En una realización particular, las células B esplénicas recogidas del animal inmunizado se fusionan con células de mieloma inmortalizadas para formar hibridomas inmortalizados que producen anticuerpos. Las células de mieloma preferiblemente no secretan polipéptidos de inmunoglobulinas (una línea celular no secretora). Los hibridomas inmortalizados se criban mediante el uso del antígeno de OX40 (p.ej., el OX40R, una porción del mismo, o una célula que expresa el OX40R). El

cribado inicial se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el uso de un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo. Un ejemplo de cribado mediante ELISA se describe en el documento WO 00/37504.

Las células que producen anticuerpos hacia OX40R, p.ej. hibridomas, se seleccionan, se clonan, y se criban adicionalmente en busca de características deseables, que incluyen un crecimiento robusto, una producción elevada de anticuerpos, y características de los anticuerpos deseables, tal como se discute adicionalmente más adelante. Los hibridomas se pueden expandir *in vivo* en animales singénicos, en animales que carecen de sistema inmunitario, p.ej., ratones atímicos, o en cultivo celular *in vitro*.

Así, se proporcionan métodos para producir una célula que produce un anticuerpo monoclonal humano hacia OX40R o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende: (a) inmunizar un animal transgénico no humano con un antígeno de OX40R; (b) permitir que el animal genere una respuesta inmunitaria hacia el antígeno de OX40R; (c) aislar las células que producen anticuerpos del animal; y (d) immortalizar las células que producen anticuerpos. En una realización, el método comprende además (e) crear poblaciones monoclonales individuales de las células que producen anticuerpos immortalizadas; y (f) cribar las células que producen anticuerpos immortalizadas que producen un anticuerpo hacia OX40R deseado.

Ácidos nucleicos, vectores, células hospedadoras, y métodos recombinantes para producir anticuerpos hacia OX40R

Otro aspecto de la descripción proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una secuencia de aminoácidos de una molécula de unión que se une al OX40R humano. La secuencia de aminoácidos codificada por la molécula de ácido nucleico puede ser cualquier porción de un anticuerpo intacto, tal como una CDR, una secuencia que comprende una, dos o tres CDRs, o una región variable de una cadena pesada o de una cadena ligera, o puede ser una cadena pesada o cadena ligera de longitud completa. En ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos que comprende (1) una región CDR3, en particular una región CDR3 de la cadena pesada, de los anticuerpos 11D4 ó 18D8; (2) una región variable de una cadena pesada o una región variable de una cadena ligera de los anticuerpos 11D4 ó 18D8; o (3) una cadena pesada o una cadena ligera de los anticuerpos 11D4 ó 18D8. En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°s: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, y 22. En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N°s: 11, 12, 23, y 24.

Las moléculas de ácido nucleico proporcionadas por la descripción se pueden obtener de cualquier fuente que produzca un anticuerpo hacia OX40R. El mRNA de las células que producen anticuerpos hacia OX40R se puede aislar mediante técnicas habituales, se puede clonar y/o amplificar mediante el uso de PCR y técnicas de construcción de bibliotecas, y se puede cribar mediante el uso de protocolos habituales para obtener moléculas de ácido nucleico que codifican una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo hacia OX40R. El mRNA se puede usar para producir cADN para el uso en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o para la clonación de cADN de genes de anticuerpos. En una realización, la molécula de ácido nucleico se obtiene de un hibridoma que expresa un anticuerpo hacia OX40R, como se describió anteriormente, preferiblemente un hibridoma que tiene como una de sus parejas de fusión una célula de animal transgénico no humano que expresa genes de inmunoglobulinas humanas. En otra realización, el hibridoma deriva de un animal no transgénico no humano.

Se puede construir una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo hacia OX40R fusionando una molécula de ácido nucleico que codifica la región variable pesada con una molécula de ácido nucleico que codifica una región constante de una cadena pesada. De forma similar, se puede construir una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de un anticuerpo hacia OX40R fusionando una molécula de ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena ligera con una molécula de ácido nucleico que codifica una región constante de una cadena ligera. Las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas VH y VL se pueden convertir en genes de anticuerpos de longitud completa insertándolos en vectores de expresión que ya codifican las regiones constantes de la cadena pesada y las regiones constantes de la cadena ligera, respectivamente, de forma que el segmento VH está unido de forma operable a el/los segmento(s) de la región constante de la cadena pesada (CH) en el vector y el segmento VL está unido de forma operable al segmento de la región constante de la cadena ligera (CL) en el vector. De manera alternativa, las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas VH o VL se convierten en genes de anticuerpos de longitud completa mediante la unión, p.ej., ligadura, de la molécula de ácido nucleico que codifica una cadena VH a una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena CH mediante el uso de técnicas de biología molecular habituales. Esto mismo se puede llevar a cabo mediante el uso de moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas VL y CL. Las secuencias de los genes de la región constante de las cadenas pesadas y ligeras humanas se conocen en la técnica. Véase, p.ej., Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., publ. del NIH N° 91-3242, 1991. Las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa se pueden expresar entonces a partir de una célula en la que se han introducido, y se puede aislar el anticuerpo hacia OX40R.

Las moléculas de ácido nucleico se pueden usar para expresar de manera recombinante grandes cantidades de anticuerpos hacia OX40R, como se describe más adelante. Las moléculas de ácido nucleico se pueden usar también para producir otras moléculas de unión proporcionadas por la descripción, tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena simple, inmunoadhesinas, diacuerpos, anticuerpos mutados, y derivados de

anticuerpos, como se describe en otra parte en la presente memoria. En una realización, se usa una molécula de ácido nucleico como sonda o cebador de PCR para secuencias específicas de anticuerpos. Por ejemplo, se puede usar una sonda de molécula de ácido nucleico en métodos de diagnóstico o se puede usar un cebador de PCR de molécula de ácido nucleico para amplificar regiones de ADN que se podrían usar, entre otros, para aislar secuencias de ácido nucleico para el uso en la producción de regiones variables de los anticuerpos hacia OX40R.

Una vez que se obtienen moléculas de ADN que codifican los segmentos V_H y V_L de un anticuerpo hacia OX40R, estas moléculas de ADN se pueden manipular adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de cadenas de anticuerpos de longitud completa, en genes de fragmentos Fab, o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, una molécula de ADN que codifica V_L o V_H se une de forma operable a otra molécula de ADN que codifica otro polipéptido, tal como una región constante de anticuerpo o un ligador flexible. La expresión "unido de forma operable," tal como se usa en este contexto, significa que las dos moléculas de ADN están unidas de forma que las secuencias de aminoácidos codificadas por las dos moléculas de ADN permanecen en el marco de lectura.

La molécula de ADN aislada que codifica la región V_H se puede convertir en un gen de la cadena pesada de longitud completa uniendo de forma operable la molécula de ADN que codifica V_H a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de la región constante de la cadena pesada humana se conocen en la técnica (véase, p.ej., Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Sociales de EE.UU., publicación del NIH N° 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero lo más preferiblemente es una región constante de IgG1 o IgG2. La secuencia de la región constante de IgG1 puede ser cualquiera de los diversos alelos o alotipos que se sabe que se dan entre individuos diferentes, tales como Gm(1), Gm(2), Gm(3), y Gm(17). Estos alotipos representan sustituciones de aminoácidos que se dan de manera natural en las regiones constantes de IgG1. Para un gen de la cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica V_H se puede unir de forma operable a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante CH1 de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada CH1 puede derivar de cualquiera de los genes de las cadenas pesadas.

La molécula de ADN aislada que codifica la región V_L se puede convertir en un gen de la cadena ligera de longitud completa (así como un gen de la cadena ligera de Fab) uniendo de forma operable la molécula de ADN que codifica V_L a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, C_L . Las secuencias de genes de la región constante de la cadena ligera humana se conocen en la técnica (véase p.ej., Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Sociales de EE.UU., publicación del NIH N° 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda. La región constante kappa puede ser cualquiera de los diversos alelos que se sabe que se dan entre individuos diferentes, tales como Inv(1), Inv(2), e Inv(3). La región constante lambda puede derivar de cualquiera de los tres genes lambda.

Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L se unen de forma operable a otro fragmento que codifica un ligador flexible, p.ej., que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de forma que las secuencias V_H y V_L se pueden expresar como una proteína de cadena simple contigua, con las regiones V_L y V_H unidas por el ligador flexible (Véase p.ej., Bird et al., (1988) *Science* 242:423-426; Huston et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) *Nature* 348:552-554). El anticuerpo de cadena simple puede ser monovalente, si solamente se usa una única V_H y V_L , bivalente, si se usan dos V_H y V_L , o polivalente, si se usan más de dos V_H y V_L . Se pueden generar anticuerpos biespecíficos o polivalentes que se unen de manera específica a OX40R y a otra molécula.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico descrita anteriormente en la presente memoria. La molécula de ácido nucleico puede codificar una porción de una cadena ligera o cadena pesada (tal como una CDR o una región variable), una cadena ligera o pesada de longitud completa, un polipéptido que comprende una porción o longitud completa de una cadena pesada o ligera, o una secuencia de aminoácidos de un derivado de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. Para expresar una molécula de unión, se inserta una molécula de ADN que codifica una molécula de unión de longitud parcial o completa en un vector de expresión de forma que la molécula de ADN está unida de forma operable a secuencias de control transcripcionales y traduccionales. En este contexto, el término "unido de forma operable" pretende significar que la molécula de ADN se liga en un vector de forma que las secuencias de control transcripcionales y traduccionales del vector cumplen su función deseada de regular la transcripción y la traducción de la molécula de ADN. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la célula hospedadora de expresión usada. Los vectores de expresión incluyen, por ejemplo, plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados (AAV), virus vegetales tales como virus del mosaico de la coliflor, virus del mosaico del tabaco, cósmidos, YACs, y episomas derivados de EBV. La molécula de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y la molécula de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se pueden insertar en vectores diferentes o en el mismo vector. La molécula de ADN se inserta en el vector de expresión mediante cualquier método adecuado (p.ej., ligadura de sitios de restricción complementarios

del fragmento génico del anticuerpo y del vector, o ligadura de extremos romos si no hay presentes sitios de restricción).

Un ejemplo de un vector de expresión adecuado es uno que codifica una secuencia de inmunoglobulina C_H o C_L humana funcionalmente completa, con sitios de restricción adecuados modificados de forma que se puede insertar y expresar cualquier secuencia V_H o V_L. El vector de expresión también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la secuencia de aminoácidos de la cadena de anticuerpo desde una célula hospedadora. El ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de una cadena de anticuerpo se puede clonar en el vector de forma que el péptido señal está unido en el marco de lectura al extremo amino de la secuencia de aminoácidos de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína que no es una inmunoglobulina).

Además de la secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo hacia OX40R (genes de las cadenas del anticuerpo), los vectores de expresión portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de las cadenas del anticuerpo en una célula hospedadora. El diseño del vector de expresión, que incluye la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras para la expresión en una célula hospedadora de mamífero incluyen elementos virales que dirigen niveles elevados de expresión proteica en las células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de LTRs retrovirales, citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/potenciador de CMV), Virus simio 40 (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus, (p.ej., el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)), poliovirus y promotores de mamífero potentes tales como los promotores nativos de inmunoglobulinas y actina. Para una descripción adicional de los elementos reguladores virales, y las secuencias de los mismos, véanse, p.ej., las patentes de EE.UU. N°s 5.168.062, 4.510.245, y 4.968.615.

Además de las secuencias de ácido nucleico de las cadenas de los anticuerpos y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en las células hospedadoras y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véanse, p.ej., las patentes de EE.UU. N°s 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Los genes marcadores seleccionables incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para el uso en células hospedadoras dhfr- con selección/amplificación con metotrexato), el gen de neomicina fosfotransferasa (para la selección de G418), y el gen de glutamato sintetasa. El diseño del vector de expresión, que incluye la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de varios factores, tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de unión y los vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico se pueden usar para la transformación de una célula hospedadora adecuada para la producción recombinante de una molécula de unión. Una célula hospedadora adecuada se transforma con uno o más vectores de expresión que portan las moléculas de ácido nucleico que codifican una secuencia de aminoácidos de una molécula de unión de forma que la secuencia de aminoácidos se expresa en la célula hospedadora y, en general, se secreta en el medio en el que se cultiva la célula hospedadora, y del que se puede recuperar la secuencia de aminoácidos. La transformación de las células hospedadoras se puede llevar a cabo mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, tales como los descritos en las patentes de EE.UU. N°s 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461, y 4.959.455.

La célula hospedadora puede ser una célula de mamífero, insecto, planta, bacteria, o levadura. Los ejemplos de líneas celulares de mamífero adecuadas como células hospedadoras incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO), células NSO, células SP2, células HEK-293T, células NIH-3T3, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono verde africano (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p.ej., Hep G2), células A549, y otras diversas líneas celulares. Los ejemplos de líneas celulares de insecto incluyen las células Sf9 o Sf21. Los ejemplos de células hospedadoras vegetales incluyen Nicotiana, Arabidopsis, lenteja de agua, maíz, trigo, patata, etc. Las células hospedadoras bacterianas incluyen E. coli y la especie Streptomyces. Los ejemplos de células hospedadoras de levadura incluyen Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces cerevisiae, y Pichia pastoris.

Las secuencias de aminoácidos de una molécula de unión expresada por líneas celulares diferentes o en animales transgénicos pueden tener una glicosilación diferente. Sin embargo, todas las moléculas de unión codificadas por las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en la presente memoria o que comprenden las secuencias de aminoácidos proporcionadas en la presente memoria son parte de la presente invención, independientemente de la glicosilación de las moléculas de unión.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para producir un anticuerpo hacia OX40R o fragmento de unión al antígeno del mismo mediante el uso de expresión en fago. El método comprende (a) sintetizar una biblioteca de anticuerpos humanos en un fago, (b) cribar la biblioteca con el OX40R o una porción del mismo, (c) aislar del fago que se une al OX40R o a una porción del mismo, y (d) obtener el anticuerpo del fago. Un método ejemplar para preparar la biblioteca de anticuerpos comprende la etapa de: (a) inmunizar a un animal no humano que comprende loci de inmunoglobulinas humanas con OX40R o una porción antigénica del mismo para crear una respuesta inmunitaria; (b) extraer las células que producen anticuerpos del animal inmunizado; (c) aislar el ARN que

codifica las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos hacia OX40R de las células extraídas; (d) transcribir inversamente el ARN para producir cADN; (e) amplificar el cADN; y (f) insertar el cADN en un vector de expresión en fago de forma que se expresen los anticuerpos en el fago. Los anticuerpos hacia OX40R humanos recombinantes o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos se pueden aislar mediante el cribado de una biblioteca de anticuerpos combinatoria recombinante. La biblioteca puede ser una biblioteca de expresión en fago de scFv, generada mediante el uso de cADNs de V_L y V_H humanos preparados a partir del mRNA aislado de células B. Los métodos para preparar y cribar tales bibliotecas se conocen en la técnica. Los equipos para generar bibliotecas de expresión en fago están disponibles comercialmente (p.ej., el Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, n° de catálogo 27-9400-01; y el equipo de expresión en fago Stratagene SurfZAP™, n° de catálogo 240612).

En un caso, para aislar y producir anticuerpos hacia OX40R humanos con las características deseadas, primero se usa un anticuerpo hacia OX40R humano como se describe en la presente memoria para seleccionar secuencias de la cadena pesada y ligera humanas que tienen una actividad de unión similar hacia OX40R mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, tales como los métodos de injerto de epítomos descritos en el documento WO 93/06213. Las bibliotecas de anticuerpos usadas en este método pueden ser bibliotecas de scFv preparadas y cribadas como se describió en el documento WO 92/01047, McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); y Griffiths et al., EMBO J. 12:725-734 (1993). Las bibliotecas de anticuerpos scFv se pueden cribar mediante el uso de CCR2 humano como antígeno.

Una vez que se seleccionan las regiones V_L y V_H humanas iniciales, se llevan a cabo experimentos de "mezcla y acoplamiento", en los que se criban diferentes pares de los segmentos V_L y V_H seleccionados inicialmente en función de la unión a OX40R para seleccionar las combinaciones de pares V_L/V_H . Además, para mejorar adicionalmente la calidad del anticuerpo, los segmentos V_L y V_H de el/los par(es) V_L/V_H se pueden mutar aleatoriamente, en la región CDR3 de V_H y/o V_L , en un proceso análogo al proceso de mutación somática *in vivo* responsable de la maduración de la afinidad de los anticuerpos durante una respuesta inmunitaria natural. Esta maduración de la afinidad *in vitro* se puede llevar a cabo amplificando los dominios V_H y V_L mediante el uso de cebadores de PCR complementarios a la CDR3 de V_H o la CDR3 de V_L , respectivamente, en cuyos cebadores se ha "añadido" una mezcla aleatoria de las cuatro bases nucleotídicas en ciertas posiciones de forma que los productos de PCR resultantes codifican segmentos V_H y V_L en los que se han introducido mutaciones aleatorias en las regiones CDR3 de V_H y/o V_L . Estos segmentos V_H y V_L mutados aleatoriamente se pueden volver a cribar en función de la unión a OX40R.

Tras el cribado y el aislamiento de un anticuerpo hacia OX40R o una porción de unión al antígeno de una biblioteca de expresión de inmunoglobulinas recombinantes, los ácidos nucleicos que codifican la molécula de unión seleccionada se pueden recuperar del paquete de expresión (p.ej., del genoma del fago) y subclonarlos en otros vectores de expresión mediante técnicas de ADN recombinante. Si se desea, el ácido nucleico se puede manipular adicionalmente para crear otras formas de anticuerpos, como se describe más adelante. Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado mediante cribado de una biblioteca combinatoria, el ADN que codifica el anticuerpo se clona en un vector de expresión recombinante y se introduce en células hospedadoras de mamífero, como se describió anteriormente.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición, p.ej., una composición farmacéutica, que contiene una o una combinación de moléculas de unión proporcionadas por la descripción, y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones se pueden preparar mediante métodos convencionales conocidos en la técnica.

En ciertas realizaciones, la composición comprende un anticuerpo hacia OX40R o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En una realización particular, la composición comprende el anticuerpo 11D4 o el anticuerpo 18D8, o un fragmento de unión al antígeno de cualquiera de los dos anticuerpos. En otras realizaciones, la composición comprende un derivado del anticuerpo 11D4 o del anticuerpo 18D8.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier sustancia inactiva que es adecuada para el uso en una formulación para la administración de una molécula de unión. Un vehículo puede ser un antiadherente, aglutinante, revestimiento, disgregante, relleno o diluyente, conservante (tal como agente antioxidante, antibacteriano, o antifúngico), edulcorante, agente retardante de la absorción, agente humectante, agente emulsionante, tampón, y similares. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilen glicol, polietilen glicol, y similares) dextrosa, aceites vegetales (tales como aceite de oliva), solución salina, tampón, solución salina tamponada, y agentes isotónicos tales como carbohidratos, polialcoholes, sorbitol, y cloruro sódico.

Las composiciones pueden estar en cualquier forma adecuada, tales como formas farmacéuticas líquidas, semi-sólidas, y sólidas. Los ejemplos de formas farmacéuticas líquidas incluyen la solución (p.ej., soluciones inyectables e infundibles), microemulsión, liposoma, dispersión, o suspensión. Los ejemplos de formas farmacéuticas sólidas incluyen un comprimido, píldora, cápsula, microcápsula, y polvo. Una forma particular de la composición adecuada para administrar una molécula de unión es un líquido estéril, tal como una solución, suspensión, o dispersión, para inyección o infusión. Las soluciones estériles se pueden preparar incorporando el anticuerpo en la cantidad

necesaria en un vehículo adecuado, seguido de esterilización mediante microfiltración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el anticuerpo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y otros vehículos. En el caso de polvos estériles para la preparación de un líquido estéril, los métodos de preparación incluyen el secado a vacío y la liofilización para proporcionar un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una disolución previamente esterilizada mediante filtración del mismo. Las diversas formas farmacéuticas de las composiciones se pueden preparar mediante métodos convencionales conocidos en la técnica.

La cantidad relativa de una molécula de unión incluida en la composición variará dependiendo de varios factores, tales como la molécula de unión específica y los vehículos usados, la forma farmacéutica, y las características de liberación y farmacocinéticas deseadas. La cantidad de una molécula de unión en una forma farmacéutica simple será en general la cantidad que produzca un efecto terapéutico, pero puede ser también una cantidad menor. En general, esta cantidad oscilará de alrededor del 0,01 por ciento a alrededor del 99 por ciento, de alrededor del 0,1 por ciento a alrededor del 70 por ciento, o de alrededor del 1 por ciento a alrededor del 30 por ciento respecto del peso total de la forma farmacéutica.

Además de la molécula de unión, se pueden incluir uno o más agentes terapéuticos adicionales en la composición. Los ejemplos de los agentes terapéuticos adicionales se describen más adelante en la presente memoria. La cantidad adecuada del agente terapéutico adicional a incluir en la composición puede ser seleccionada fácilmente por una persona experta en la técnica, y variará dependiendo de varios factores, tales como el agente particular y los vehículos usados, la forma farmacéutica, y las características de liberación y farmacodinámicas deseadas. La cantidad del agente terapéutico adicional incluido en una forma farmacéutica simple será en general la cantidad del agente que produzca un efecto terapéutico, pero también puede ser una cantidad menor.

Uso de las moléculas de unión y las composiciones farmacéuticas

Las moléculas de unión y las composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de unión proporcionada por la presente descripción son útiles para fines terapéuticos, diagnósticos, u otros fines, tales como estimular una respuesta inmunitaria, tratar un cáncer, aumentar la eficacia de otra terapia del cáncer, o aumentar la eficacia de una vacuna, y tienen varias utilidades, tales como para el uso como medicamentos o agentes de diagnóstico. Así, en otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos de uso de las moléculas de unión o las composiciones farmacéuticas.

En un aspecto particular, se proporcionan métodos para estimular una respuesta inmunitaria en un mamífero, que comprenden administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión proporcionada por la descripción. En ciertas realizaciones, la molécula de unión es un anticuerpo hacia OX40R o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y el mamífero es un ser humano. En una realización adicional, la molécula de unión es el anticuerpo 11D4 o el anticuerpo 18D8, o un fragmento de unión al antígeno de cualquiera de los dos anticuerpos. La expresión "estimular una respuesta inmunitaria", o sus variaciones gramaticales, significa estimular, provocar, incrementar, mejorar, o aumentar cualquier respuesta del sistema inmunitario de un mamífero. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta celular (es decir, mediada por células, tal como mediada por linfocitos T citotóxicos) o una respuesta humoral (es decir, respuesta mediada por anticuerpos), y puede ser una respuesta inmunitaria primaria o secundaria. Los ejemplos de estimulación de la respuesta inmunitaria incluyen una actividad de células T auxiliares CD4+ incrementada y la generación de células T citolíticas. La estimulación de una respuesta inmunitaria se puede determinar mediante el uso de varias medidas *in vitro* o *in vivo* conocidas para los expertos en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, ensayos de linfocitos T citotóxicos, liberación de citocinas (por ejemplo producción de IL-2), remisión de tumores, supervivencia de animales que albergan tumores, producción de anticuerpos, proliferación de células inmunitarias, expresión de marcadores de la superficie celular, y citotoxicidad. En general, los métodos de la descripción estimulan la respuesta inmunitaria de un mamífero en comparación con la respuesta inmunitaria de un mamífero sin tratar o de un animal sin tratar mediante el uso de los métodos reivindicados. En una realización, el método estimula una respuesta inmunitaria celular, en particular una respuesta de células T citotóxicas. En otra realización, la respuesta inmunitaria celular es una respuesta de células T auxiliares. En otra realización, la respuesta inmunitaria es una producción de citocinas, en particular la producción de IL-2.

En otro aspecto particular, la presente descripción proporciona un método para tratar un cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión proporcionada por la descripción. La expresión "tratar un cáncer" o "tratamiento de un cáncer" se refiere a provocar un efecto deseable o beneficioso en un mamífero al que se le ha diagnosticado un cáncer. El efecto deseable o beneficioso puede incluir la inhibición del crecimiento o de la proliferación adicional de las células cancerosas, la muerte de las células cancerosas, la inhibición de la reaparición del cáncer, la reducción del dolor asociado al cáncer, o una supervivencia mejorada del animal. La inhibición de la reaparición del cáncer contempla la localización del cáncer y el tejido circundante que se han tratado previamente mediante radiación, quimioterapia, cirugía, u otras técnicas. El efecto puede ser subjetivo u objetivo. Por ejemplo, si el animal es humano, el humano puede notar un vigor o vitalidad mejorada o un dolor disminuido como síntomas subjetivos de la mejora o respuesta a la terapia. De manera alternativa, el médico puede notar una disminución del tamaño del tumor o de la masa tumoral basándose en un examen físico, parámetros de laboratorio, marcadores tumorales o hallazgos radiográficos. Algunos indicios de laboratorio que el médico puede observar para la respuesta al tratamiento incluyen la normalización de ensayos,

tales como el recuento de leucocitos, el recuento de eritrocitos, el recuento de plaquetas, la velocidad de sedimentación de eritrocitos, y diversas concentraciones de enzimas. Además, el médico puede observar una disminución de un marcador tumoral detectable. De manera alternativa, se pueden usar otros ensayos para determinar una mejora objetiva, tales como sonogramas, pruebas de resonancia magnética nuclear y pruebas de emisión de positrones. En ciertas realizaciones, la molécula de unión es un anticuerpo hacia OX40R o un fragmento de unión al antígeno del mismo proporcionado por la descripción. En una realización adicional, la molécula de unión es el anticuerpo 11D4 o 18D8, o un fragmento de unión al antígeno de cualquiera de los dos anticuerpos. En una realización adicional, el mamífero es un ser humano.

En otro aspecto particular, la presente descripción proporciona un método para prevenir un cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión proporcionada por la descripción. Las expresiones "prevenir un cáncer" o "prevención de un cáncer" se refieren a retrasar, inhibir, o prevenir el inicio de un cáncer en un mamífero en el que el inicio de la oncogénesis o tumorigénesis no se ha demostrado, pero se ha identificado una predisposición al cáncer, determinada mediante cribado genético, por ejemplo, o de otra manera. La expresión también abarca tratar a un mamífero que tiene afecciones premalignas para detener la progresión, o provocar la regresión, de las afecciones premalignas hacia la neoplasia maligna. Los ejemplos de afecciones premalignas incluyen hiperplasia, displasia, y metaplasia. En ciertas realizaciones, la molécula de unión es un anticuerpo hacia OX40R o un fragmento del mismo proporcionado por la descripción. En una realización adicional, la molécula de unión es el anticuerpo 11D4 o 18D8, o un fragmento de unión al antígeno de cualquiera de los dos anticuerpos. En una realización adicional, el mamífero es un ser humano.

Se puede tratar o prevenir una diversidad de cánceres, ya sean malignos o benignos y ya sean primarios o secundarios, con un método proporcionado por la descripción. Los ejemplos de tales cánceres incluyen cánceres de pulmón tales como carcinoma broncogénico (p.ej., carcinoma de células escamosas, carcinoma de células pequeñas, carcinoma de células grandes, y adenocarcinoma), carcinoma de células alveolares, adenoma bronquial, hamartoma condromatoso (no canceroso), y sarcoma (canceroso); cáncer de corazón tal como mixoma, fibromas, y rhabdomiomas; cánceres óseos tales como osteocondromas, condromas, condroblastomas, fibromas condromixoides, osteomas osteoides, tumores de células gigantes, condrosarcoma, mieloma múltiple, osteosarcoma, fibrosarcomas, histiocitomas fibrosos malignos, tumor de Ewing (sarcoma de Ewing), y sarcoma de células reticulares; cáncer de cerebro tal como gliomas (p.ej., glioblastoma multiforme), astrocitomas anaplásicos, astrocitomas, oligodendrogliomas, meduloblastomas, cordoma, Schwannomas, ependimomas, meningiomas, adenoma de hipófisis, pinealoma, osteomas, hemangioblastomas, craneofaringiomas, cordomas, germinomas, teratomas, quistes dermoides, y angiomas; cánceres del sistema digestivo tales como leiomioma, carcinoma epidermoide, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma, adenocarcinomas de estómago, lipomas intestinales, neurofibromas intestinales, fibromas intestinales, pólipos del intestino grueso, y cánceres colorrectales; cánceres hepáticos tales como adenomas hepatocelulares, hemangioma, carcinoma hepatocelular, carcinoma fibrolamelar, colangiocarcinoma, hepatoblastoma, y angiosarcoma; cánceres de riñón tales como adenocarcinoma renal, carcinoma de células renales, hipernefoma, y carcinoma de células de transición de la pelvis renal; cánceres de vejiga; cánceres hematológicos tales como leucemia linfocítica aguda (linfoblástica), leucemia mieloide aguda (mielocítica, mielógena, mieloblástica, mielomonocítica), leucemia linfocítica crónica (p.ej., síndrome de Sezary y tricoleucemia), leucemia mielocítica crónica (mieloide, mielógena, granulocítica), linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células B, micosis fungoide, y trastornos mieloproliferativos (que incluyen trastornos mieloproliferativos tales como policitemia vera, mielofibrosis, trombocitemia, y leucemia mielocítica crónica); cánceres cutáneos tales como carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, melanoma, sarcoma de Kaposi, y enfermedad de Paget; cánceres de cabeza y cuello; cánceres relacionados con los ojos, tales como retinoblastoma y melanocarcinoma intraocular; cánceres del sistema reproductor masculino, tales como hiperplasia prostática benigna, cáncer de próstata, y cánceres testiculares (p.ej., seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, y coriocarcinoma); cáncer de mama; cánceres del sistema reproductor femenino, tales como cáncer uterino (carcinoma endometrial), cáncer de cuello del útero (carcinoma de cuello del útero), cáncer de ovario (carcinoma ovárico), carcinoma vulvar, carcinoma vaginal, cáncer de trompas de Falopio, y mola hidatidiforme; cáncer de tiroides (que incluye cáncer papilar, folicular, anaplásico, o medular); feocromocitomas (glándula suprarrenal); crecimientos no cancerosos de las glándulas paratiroides; cánceres pancreáticos; y cánceres hematológicos tales como leucemias, mielomas, linfomas no Hodgkin, y linfomas de Hodgkin.

Al poner en práctica los métodos terapéuticos, las moléculas de unión se pueden administrar solas como monoterapia, o se pueden administrar en combinación con uno o más agentes terapéuticos o terapias adicionales. Así, en otro aspecto, la presente descripción proporciona una terapia de combinación, que comprende una molécula de unión proporcionada por la descripción en combinación con una o más terapias o agentes terapéuticos adicionales. La expresión "terapia adicional" se refiere a una terapia que no emplea una molécula de unión proporcionada por la descripción como agente terapéutico. La expresión "agente terapéutico adicional" se refiere a cualquier agente terapéutico distinto de una molécula de unión proporcionada por la descripción. En ciertas realizaciones, la molécula de unión es el anticuerpo 11D4 o 18D8, o un fragmento de unión al antígeno de cualquiera de los dos anticuerpos. En un aspecto particular, la presente descripción proporciona una terapia de combinación para tratar el cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión proporcionada por la descripción en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En una realización adicional, el mamífero es un ser humano.

Se puede usar una amplia diversidad de agentes terapéuticos del cáncer en combinación con una molécula de unión. Alguien de experiencia habitual en la técnica reconocerá la presencia y el desarrollo de otras terapias del cáncer que se pueden usar en combinación con los métodos y moléculas de unión de la presente descripción, y no se limitará a las formas de terapia expuestas en la presente memoria. Los ejemplos de categorías de agentes terapéuticos adicionales que se pueden usar en la terapia de combinación para tratar el cáncer incluyen (1) agentes quimioterapéuticos, (2) agentes inmunoterapéuticos, y (3) agentes terapéuticos hormonales.

La expresión "agente quimioterapéutico" se refiere a una sustancia química o biológica que puede provocar la muerte de células cancerosas, o interferir con el crecimiento, la división, la reparación, y/o la función de las células cancerosas. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen los que se describen en los documentos WO 2006/088639, WO 2006/129163, y US 2006/0153808. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos particulares incluyen: (1) agentes alquilantes, tales como clorambucilo (LEUKERAN), ciclofosfamida (CYTOXAN), ifosfamida (IFEX), hidrociluro de mecloretamina (MUSTARGEN), tiotepa (THIOPLEX), estreptozotocina (ZANOSAR), carmustina (BICNU, OBLEA GLIADEL), lomustina (CEENU), y dacarbazina (DTIC-DOME); (2) alcaloides o alcaloides de la vinca, que incluyen antibióticos citotóxicos, tales como doxorubicina (ADRIAMYCIN), epirubicina (ELLENCE, PHARMORUBICIN), daunorubicina (CERUBIDINE, DAUNOXOME), nemorubicina, idarubicina (IDAMYCIN PFS, ZAVEDOS), mitoxantrona (DHAD, NOVANTRONE), dactinomicina (actinomicina D, COSMEGEN), plicamicina (MITHRACIN), mitomicina (MUTAMYCIN), y bleomicina (BLENOXANE), tartrato de vinorelbina (NAVELBINE), vinblastina (VELBAN), vincristina (ONCOVIN), y vindesina (ELDISINE); (3) antimetabolitos, tales como capecitabina (XELODA), citarabina (CYTOSAR-U), fludarabina (FLUDARA), gemcitabina (GEMZAR), hidroxiurea (HYDRA), metotrexato (FOLEX, MEXATE, TREXALL), nelarabina (ARRANON), trimetrexato (NEUTREXIN), y pemetrexed (ALIMTA); (4) Antagonistas de pirimidina, tales como 5-fluorouracilo (5-FU); capecitabina (XELODA), raltitrexed (TOMUDEX), tegafur-uracilo (UFTORAL), y gemcitabina (GEMZAR); (5) taxanos, tales como docetaxel (TAXOTERE), paclitaxel (TAXOL); (6) fármacos de platino, tales como cisplatino (PLATINOL) y carboplatino (PARAPLATIN), y oxaliplatino (ELOXATIN); (7) inhibidores de topoisomerasas, tales como irinotecano (CAMPOTOSAR), topotecano (HYCAMTIN), etopósido (ETOPOPHOS, VEPESSID, TOPOSAR), y tenipósido (VUMON); (8) epipodofilotoxinas (derivados de podofilotoxina), tales como etopósido (ETOPOPHOS, VEPESSID, TOPOSAR); (9) derivados de ácido fólico, tales como leucovorina (WELLCOVORIN); (10) nitrosoureas, tales como carmustina (BICNU), lomustina (CeeNU); (11) inhibidores de tirosina quinasas de receptores, que incluyen el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), receptor de insulina, receptor de factor de crecimiento similar a insulina (IGFR), receptor de factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR), y receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), tales como gefitinib (IRESSA), erlotinib (TARCEVA), bortezumib (VELCADE), mesilato de imatinib (GLEEVEC), genefitinib, lapatinib, sorafenib, talidomida, suunitadinitib (SUTENT), axitinib, rituximab, trastuzumab (HERCEPTIN), cetuximab (ERBITUX), bevacizumab (AVASTIN), y ranibizumab (LUCENTIS), lym-1 (ONCOLYM), anticuerpos hacia el receptor -1 del factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1R) que se describen en el documento WO2002/053596; (12) inhibidores de la angiogénesis, tales como bevacizumab (AVASTIN), suramina (GERMANIN), angiostatina, SU5416, talidomida, e inhibidores de metaloproteinasas de la matriz (tales como batimastat y marimastat), y los que se describen en el documento WO2002/055106; y (13) inhibidores del proteosoma, tales como bortezumib (VELCADE).

La expresión "agentes inmunoterapéuticos" se refiere a una sustancia química o biológica que puede estimular una respuesta inmunitaria de un mamífero. Los ejemplos de agentes inmunoterapéuticos incluyen: bacilo de Calmette-Guerin (BCG); citocinas tales como interferones; vacunas tales como la inmunoterapia personalizada MyVax, Onyvac-P, Oncophage, GRNVAC1, Favld, Provenge, GVAX, Lovaxin C, BiovaxID, GMXX, y NeuVax; y anticuerpos tales como alemtuzumab (CAMPATH), bevacizumab (AVASTIN), cetuximab (ERBITUX), gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG), ibritumomab tiuxetan (ZEVALIN), panitumumab (VECTIBIX), rituximab (RITUXAN, MABTHERA), trastuzumab (HERCEPTIN), tositumomab (BEXXAR), tremelimumab, CAT-3888, y anticuerpos agonistas hacia el receptor CD40 que se describen en el documento WO2003/040170.

La expresión "agente terapéutico hormonal" se refiere a una sustancia química o biológica que inhibe o elimina la producción de una hormona, o inhibe o contrarresta el efecto de una hormona sobre el crecimiento y/o la supervivencia de las células cancerosas. Los ejemplos de tales agentes adecuados para los métodos de la presente memoria incluyen los que se describen en el documento US2007/0117809. Los ejemplos de agentes terapéuticos hormonales particulares incluyen tamoxifeno (NOLVADEX), toremifeno (Fareston), fulvestrant (FASLODEX), anastrozol (ARIMIDEX), exemestano (AROMASIN), letrozol (FEMARA), acetato de megestrol (MEGACE), goserelina (ZOLADEX), y leuprolida (LUPRON). Las moléculas de unión de esta descripción se pueden usar también en combinación con terapias hormonales no farmacológicas tales como (1) métodos quirúrgicos que eliminan todo o parte de los órganos o glándulas que participan en la producción de la hormona, tales como los ovarios, los testículos, la glándula suprarrenal, y la hipófisis, y (2) tratamiento con radiación, en el que los órganos o glándulas del paciente se someten a radiación en una cantidad suficiente para inhibir o eliminar la producción de la hormona seleccionada como objetivo.

La terapia de combinación para tratar el cáncer también abarca la combinación de una molécula de unión proporcionada por la descripción con cirugía para extraer un tumor. La molécula de unión se puede administrar al mamífero antes, durante, o después de la cirugía.

La terapia de combinación para tratar el cáncer también abarca la combinación de una molécula de unión

proporcionada por la descripción con la radioterapia, tal como la radioterapia ionizante (electromagnética) (p.ej., rayos X o rayos gamma) y la radioterapia de haces de partículas (p.ej., radiación de energía lineal elevada). La fuente de radiación puede ser externa o interna al mamífero. La molécula de unión se puede administrar al mamífero antes, durante, o después de la radioterapia.

5 Administración de las moléculas de unión y composiciones

Las moléculas de unión y composiciones proporcionadas por la presente descripción se pueden administrar por medio de cualquier vía enteral o vía parenteral adecuada de administración. El término "vía enteral" de administración se refiere a la administración por medio de cualquier parte del tracto gastrointestinal. Los ejemplos de vías enterales incluyen la vía oral, mucosa, bucal, y rectal, o la vía intragástrica. "Vía parenteral" de administración se refiere a una vía de administración distinta de la vía enteral. Los ejemplos de vías parenterales de administración incluyen la administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intratumoral, intravesical, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, transtraqueal, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal, subcutánea, o tópica. Los anticuerpos y las composiciones de la descripción se pueden administrar mediante el uso de cualquier método adecuado, tal como mediante ingestión oral, tubo nasogástrico, tubo de gastrostomía, inyección, infusión, bomba de infusión implantable, y bomba osmótica. La vía y el método adecuado de administración puede variar dependiendo de varios factores tales como el anticuerpo específico que se va a usar, la velocidad de absorción deseada, la formulación específica o la forma farmacéutica usada, el tipo o gravedad del trastorno que se va a tratar, el sitio específico de acción, y las afecciones del paciente, y pueden ser seleccionados fácilmente por una persona experta en la técnica

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" de una molécula de unión se refiere a una cantidad que es eficaz para un propósito terapéutico deseado. Por ejemplo, en el contexto de la estimulación de una respuesta inmunitaria, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es cualquier cantidad que es eficaz para estimular, provocar, incrementar, mejorar, o aumentar cualquier respuesta de un sistema inmunitario de un mamífero. En el contexto del tratamiento del cáncer, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es cualquier cantidad que es suficiente para provocar cualquier efecto deseable o beneficioso en el mamífero a tratar, tal como la inhibición del crecimiento o la proliferación adicional de las células cancerosas, la muerte de las células cancerosas, la inhibición de la reaparición del cáncer, la reducción del dolor asociado al cáncer, o una supervivencia mejorada del mamífero. En un método para prevenir el cáncer, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es cualquier cantidad que es eficaz para retrasar, inhibir, o prevenir el inicio de un cáncer en el mamífero al que se le administra la molécula de unión. La cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión normalmente oscila de alrededor de 0,001 a alrededor de 500 mg/kg, y más normalmente alrededor de 0,05 a alrededor de 100 mg/kg, del peso corporal del mamífero. Por ejemplo, la cantidad puede ser de alrededor de 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 50 mg/kg, o 100 mg/kg del peso corporal del mamífero. En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo hacia OX40R está en el intervalo de alrededor de 0,1 - 30 mg/kg del peso corporal del mamífero. El nivel de dosis precisa a administrar puede ser determinado fácilmente por una persona experta en la técnica, y dependerá de varios de factores, tales como el tipo y la gravedad del trastorno a tratar, la molécula de unión particular empleada, la vía de administración, el momento de la administración, la duración del tratamiento, la terapia adicional particular empleada, la edad, el sexo, el peso, la afección, la salud general y el historial médico anterior del paciente que se va a tratar, y factores similares muy conocidos en las técnicas médicas.

Una molécula de unión o composición se administra normalmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis únicas pueden ser, por ejemplo, semanales, mensuales, cada tres meses o anuales. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez cada semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosis típicos para un anticuerpo hacia OX40R incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal por medio de administración intravenosa, mediante el uso de uno de los siguientes calendarios de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosis, entonces cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de anticuerpos hacia OX40R

Se prepararon anticuerpos ilustrativos de acuerdo con la descripción, se seleccionaron, y se ensayaron como sigue:

Inmunización con el antígeno de OX40R y selección de los ratones que producen anticuerpos monoclonales hacia OX40R:

Se prepararon anticuerpos monoclonales completamente humanos hacia OX40R humano mediante el uso de las cepas de ratones transgénicos de Ig humana HCo7, HCo12, HCo17, y HCo27, así como la cepa transcromosómica/transgénica humana, KM (Medarex, Inc.). Todas estas cepas expresan anticuerpos completamente humanos que son indistinguibles de los anticuerpos aislados de humanos.

En las cepas transgénicas, tanto el gen de la cadena ligera kappa de ratón endógeno como el gen de la cadena pesada de ratón endógeno se alteraron de manera homocigota como se describe en Chen et al. (1993) EMBO J.

12:821-830 y en el Ejemplo 1 del documento WO 01/09187, respectivamente. Además, portan un transgén de la cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851. En contraste, las cepas transgénicas son distintas con respecto a sus genes de la cadena pesada humana. La cepa HCo7 porta el transgén de la cadena pesada humana HCo7 como se describe en las patentes de EE.UU. N°s: 5.545.806, 5.625.825, y 5.545.807; la cepa HCo12 porta el transgén de la cadena pesada humana HCo12 como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 01/09187; la cepa HCo17 porta el transgén de la cadena pesada humana HCo17 como se describe en el Ejemplo 8 de Deshpande et al., documento US 2005/0191293A1; la cepa HCo27 porta el transgén de la cadena pesada humana HCo27 como se describe en el Ejemplo 5 del documento PCT/US2008/072640 presentado el 08 de agosto de 2008. La cepa KM porta un minicromosoma humano como se describe en Ishida et al., (2002), *Cloning and Stem Cells*, 4: 91-102.

Los esquemas de inmunización generales para los ratones HuMab se describen en Lonberg et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; y en la publicación PCT WO 98/24884.

Los ratones HuMab de las cepas HCo7, HCo12, HCo17, HCo27 y KM se inmunizaron comenzando a las 6-16 semanas de edad con 15-25 µg de proteína OX40R-Ig recombinante humana purificada y la línea de células pre-B murina, 300-19 (Reth, M. G. et al., *Nature* 312 29: 418-42, 1984; Alt, F. et al., *Cell* 27: 381-390, 1981), transfectada para expresar OX40R humano en adyuvante de Ribí. La proteína OX40R-Ig recombinante humana purificada es una construcción del dominio extracelular (aminoácidos 1-220) de OX40R humano fusionado a la región constante de IgG1 humana. La administración fue por medio de inyección intra-peritoneal, de manera subcutánea o en la planta de la pata a intervalos de 3-28 días, hasta un total de 10 inmunizaciones. La respuesta inmunitaria se monitorizó por medio de ELISA y cribado FACS como se describe más adelante.

Selección de ratones HuMab que producen anticuerpos hacia OX40R:

Para seleccionar los ratones HuMab que producen anticuerpos que se unen al OX40R, se obtuvo sangre de los ratones inmunizados y se analizaron mediante ELISA con respecto a la unión específica a la proteína recombinante OX40R humana purificada, y mediante FACS con respecto a la unión a una línea celular que expresaba OX40R humano de longitud completa, y no a una línea celular de control que no expresaba OX40R.

El ensayo de unión mediante ELISA fue como describió Fishwild et al. (1996), *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Brevemente, se revistieron placas de microtitulación mediante el uso de 50 µl/pocillo de una disolución de OX40R-Ig recombinante purificada que contenía 1 µg/ml en PBS, y se incubó durante la noche a 4 °C. Los pocillos se bloquearon después mediante el uso de 200 µl/pocillo de un 5% de suero de pollo en PBS/Tween (0,05%). Se añadieron diluciones de plasma de ratones inmunizados con OX40R a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y después se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-Fc de IgG humana de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar, las placas se revelaron con sustrato ABTS (Moss Inc., n° de producto: ABTS-1000 mg/ml) y se analizaron mediante un espectrofotómetro a DO a 405.

El ensayo FACS se llevó a cabo según los procedimientos convencionales. Brevemente, se incubaron células 300-19 que expresaban OX40R con suero de ratones inmunizados diluidos a 1:20. Las células se lavaron, y se detectó la unión del anticuerpo específico con Ab anti-IgG humana marcado con FITC. Los análisis de citometría de flujo se llevaron a cabo en un instrumento de citometría de flujo FACS (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Los ratones que desarrollaron los títulos más altos de anticuerpos hacia OX40R se usaron para las fusiones. Las fusiones se llevaron a cabo como se describe más adelante, y los sobrenadantes de los hibridomas se ensayaron con respecto a la actividad anti-OX40R mediante ELISA y FACS.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos hacia OX40R:

A los ratones seleccionados anteriormente se les aplicó un refuerzo de manera intravenosa con OX40R-Ig a los 3 días, y después otra vez a los 2 días antes del sacrificio y la extracción del bazo y/o los nódulos linfáticos.

Los esplenocitos y/o los linfocitos de los nódulos linfáticos aislados a partir de los ratones HuMab o KM inmunizados se fusionaron a células de mieloma de ratón no secretoras SP2/0 (ATCC, CRL-1581) mediante el uso de electrofusión (E-fusión, tecnología Cyto Pulse™, Cyto Pulse™ Sciences, Inc., Glen Burnie, MD), según los protocolos habituales o recomendados por el fabricante. Brevemente, se prepararon suspensiones de células individuales de esplenocitos y/o linfocitos de los nódulos linfáticos de los ratones inmunizados y después se combinaron con un número igual de células de mieloma de ratón no secretoras SP2/0; después se llevó a cabo la E-fusión.

Después, las células se colocaron en placas a 2×10^4 células/pocillo en placas de microtitulación de fondo plano, y se incubaron durante 10-14 días en medio selectivo que contenía un 10% de suero bovino fetal, 10% de medio acondicionado P388D1 (ATCC, CRL-TIB-63), 3-5% (IGEN) en DMEM (Mediatech, Herndon, VA, N° de cat. CRL 10013, con glucosa elevada, L-glutamina y piruvato sódico), HEPES 7 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 0,1 UI/mL de penicilina - 0,1 mg/mL de estreptomina, y 1x HAT (Sigma, N° de cat. CRL -P-7185).

Después de 1-2 semanas, las células se cultivaron en medio en el que el HAT se sustituyó por HT. Aproximadamente 10-14 días después de la colocación en placas de las células, los sobrenadantes de los pocillos individuales se cribaron con respecto a la presencia de anticuerpos gamma, kappa humanos. Los sobrenadantes que dieron positivo para gamma, kappa humanos se cribaron después mediante ELISA y FACS (con el uso del protocolo descrito anteriormente) en busca de anticuerpos IgG monoclonales hacia OX40R humano. Los hibridomas que secretaban anticuerpos se transfirieron a placas de 24 pocillos, se cribaron de nuevo y, si se confirmó que fueron positivos para anticuerpos monoclonales IgG hacia OX40R humano, se subclonaron al menos dos veces mediante dilución limitante. Los subclones estables se cultivaron después *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en un medio de cultivo de tejidos para la caracterización adicional.

10 Ejemplo 2: Ejemplos biológicos/farmacológicos

A. Procedimientos de estudio *in vitro*:

Unión al dominio extracelular del OX40R: Se diluyó una proteína de fusión OX40-Ig humana en tampón carbonato BupH™, pH 9,4 (Pierce, Rockford, IL), se revistió sobre placas Maxisorb de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) a 100 µl/pocillo (0,25 µg/ml) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado que contenía un 0,05% de Tween 20 (Sigma, St Louis, MO) diluido en PBS (Sigma, St Louis, MO) y se bloquearon con 300 µl/pocillo de 0,5% de BSA (Sigma, St Louis, MO) en PBS durante 1 hora a TA. A continuación, las placas se lavaron y se incubaron con anticuerpos reactivos anti-OX40 humano diluidos en tampón de bloqueo a diversas concentraciones (100 µl/pocillo) y se incubaron durante 1 hora a TA. Las placas se lavaron después y se incubaron durante una hora a TA con un anticuerpo anti-cadena kappa humana marcado con peroxidasa de rábano (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) a 25 ng/ml en tampón de bloqueo. Finalmente, las placas de ensayo se lavaron y se añadieron 100 µl/pocillo de sustrato 1-Step Turbo-TMB (Pierce, Rockford, IL) durante 30 minutos a TA. La reacción se paró añadiendo un volumen igual de H₂SO₄ 2 M, y se leyó la absorbancia a 450 nm en un Molecular Devices Spectra Max 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Unión basada en FACS a OX40R de la superficie celular: Se usaron líneas celulares que expresaban OX40R (véase más adelante) o células mononucleares de sangre periférica primarias activadas (véase más adelante) para estudiar la unión a los receptores OX40 tanto humanos como de cynomolgus. Se recogieron las células y se lavaron (5 x 10⁵ células/tubo) mediante el uso de tampón de lavado a TA. El tampón de lavado consistió en PBS, 2% de suero bovino fetal inactivado térmicamente (Hyclone, Logan, UT) y 0,02% de azida sódica (Sigma, St. Louis, MO). A continuación, se añadieron 100 µl de diversas concentraciones de anticuerpo a las células (comenzando a 30 µg/ml y con el uso de una titulación a un tercio) diluido en tampón de lavado que contenía 0,005 mg/ml de citocolasina B (Sigma, St. Louis, MO). Las células se agitaron suavemente a TA durante 3 horas. A continuación, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 0,5 ml/tubo con tampón de lavado frío y se recogieron 10.000 eventos y se analizaron mediante el uso de los programas informáticos FACSCalibur y CellQuest de Becton Dickinson (San Jose, CA).

Ensayo Biacore: El instrumento de análisis de interacciones bioespecíficas con biosensores (BIAcore 2000) usa la resonancia de plasmones superficiales para medir interacciones moleculares en un chip sensor CM5. Los cambios en los índices de refracción entre dos medios, vidrio y dextrano carboximetilado, provocados por la interacción de moléculas en el lado de dextrano del chip sensor, se miden y se informan como cambios en unidades de reflectancia arbitrarias (UR) tal como se detalla en las notas de aplicación del fabricante.

Las superficies de dextrano carboximetilado de un chip sensor CM5 se activaron mediante derivatización con N-hidroxisuccinimida 0,05 M mediada por N-etil-N'-(dimetilaminopropil) carbodiimida 0,2 M durante 7 min. Se inyectó estreptavidina (Sigma S-4762) a una concentración de 500 µg/ml, en acetato de Na 10 mM, pH 4,5, en tres superficies (Celda de Flujo 2, 3 y 4) a un caudal de 5 µl/min y se inmovilizó de manera covalente en las superficies de la celda de flujo con aproximadamente 2500 URs. Se inyectaron 35 µl de tampón de acetato de Na 10 mM en la celda de flujo-1 durante la inmovilización en lugar de antígeno para producir una superficie de blanco activado para medir la unión inespecífica. La desactivación de los ésteres de N-hidroxisuccinimida sin reaccionar en las cuatro celdas de flujo se llevó a cabo mediante el uso de hidrocloreuro de etanolamina 1 M, pH 8,5. Tras la inmovilización, las celdas de flujo se lavaron del material sin reaccionar o unido débilmente con 5 inyecciones de regeneración de 5 µl de NaOH 50 mM hasta que se alcanzó una línea base estable.

Se inyectó manualmente CD134-mulg biotinilado (Ancell 513-030), a una concentración de 10 µg/ml a un caudal de 5 µl/min en las celdas de flujo-2, 3 y 4 para conseguir 3 densidades superficiales: Fc-2=150 UR, Fc-3=375 UR y Fc-4=580 UR. Las superficies de densidades diferentes se prepararon para monitorizar la posibilidad de la unión limitada por el transporte de masas durante la fase de asociación y re-unión durante la disociación, ambos artefactos que se ven influidos por la densidad superficial que se deben evitar.

Se preparó una serie de diluciones de los anticuerpos hacia OX40R a lo largo de un intervalo de concentraciones de 666 nM a 66 pM semilogarítmicamente en tampón de funcionamiento (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,005% de polisorbato 20 (v/v)). El caudal se ajustó a 5 µl/min, y se inyectaron 25 µl de cada muestra de punto de concentración en el chip sensor con una inyección de regeneración de 5 µl de NaOH 50 mM entre cada concentración de anticuerpo inyectada. El tiempo de disociación fue de 5 min. Los datos se analizaron mediante el uso del programa informático BIAevaluation 3.0 de ajuste global (análisis por separado de cada punto de

concentración).

Caracterización de epítomos: Se usaron células 300-19 que expresaban una construcción de fusión OX40-CD40 humana recombinante correspondiente a la secuencia de aminoácidos 1-235 de OX40 (dominio extracelular y transmembrana) y la secuencia de aminoácidos 216-278 de CD40 (dominio intracelular) para el análisis de epítomos del anticuerpo. La línea celular que expresaba OX40-CD40 se cultivó en medio RPMI (Gibco, Grand Island, NY) complementado con un 10% de suero bovino fetal (Hyclone, Logan, UT), hepes 10 mM, 1% de penicilina-estreptomicina, L-glutamina 2 mM, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales y 2-mercaptoetanol 0,05 mM (Gibco, Grand Island, NY). Se lavaron células 300-19.hCD134.2 (5×10^5 células/tubo) una vez en 3 ml de tampón de lavado frío (PBS, 2% de FBS y 0,02% de azida sódica). El sobrenadante de las células se aspiró y se añadieron 100 μ l de tampón de lavado que contenía 300 μ g/ml de anticuerpo reactivo con OX40 sin conjugar primario al sedimento celular, se mezcló y se incubó durante 30 minutos a 4 °C. A continuación, se añadió un anticuerpo secundario marcado con fluorocromo al tubo, se mezcló y se incubó durante otros 30 minutos a 4 °C. Los anticuerpos marcados con fluorocromo reactivos hacia OX40 incluyeron 10 μ l de Ber Act 35 marcado con ficoeritrina (PE) (Caltag Laboratories, Burlingame, CA.), L106 marcado con PE (BD Pharmingen, San Jose, CA) o anticuerpo hacia OX40R conjugado con Alexa Fluor 647. El anticuerpo hacia OX40R se marcó con un fluorocromo mediante el uso del equipo de marcaje de proteínas Alex Fluor 647 como describió el fabricante (Molecular Probes, Eugene, OR). Tras la tinción, las células se lavaron 3 veces con tampón de lavado, se resuspendieron en tampón frío y se recogieron 10.000 eventos y se analizaron mediante el uso de los programas informáticos FACSCalibur y CellQuest de Becton Dickinson (San Jose, CA). Los anticuerpos dejaron de considerarse con unión al mismo epítipo cuando el anticuerpo primario bloqueó la tinción del anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo en más de un 80%.

Ensayo de inhibición de ligando OX40-OX40R con anticuerpo: Los anticuerpos se ensayaron con respecto a su capacidad de bloquear la unión de las células 300-19 humanas que expresan el ligando OX40 (L) a placas revestidas con la proteína de fusión OX40-IgG1 humana. La línea celular 300-19-OX40L se cultivó en medio RPMI (Gibco, Grand Island, NY) complementado con un 10% de suero bovino fetal (Hyclone, Logan, UT), HEPES 10 mM, 1% de penicilina-estreptomicina, L-glutamina 2 mM, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 2-mercaptoetanol 0,05 mM y 0,5 mg/ml de Geneticina (Gibco, Grand Island, NY). La proteína de fusión OX40-IgG1 humana contiene los primeros 220 aminoácidos de la proteína OX40 extracelular. La proteína de fusión se revistió en placas Nunc Maxisorb (Nunc, Roskilde, Dinamarca) a 100 μ /pocillo (5 μ g/ml) en tampón de revestimiento (BupH, tampón carbonato-bicarbonato, Pierce, Rockford, IL) y se incubaron durante la noche a 4 °C. A continuación, las placas se secaron sobre una toalla de papel para eliminar el líquido, se bloquearon con 200 μ l/pocillo con tampón de bloqueo (5% de leche evaporada diluida en PBS) y se incubaron a TA durante dos horas. Las placas se lavaron con PBS y después se añadieron diversas diluciones de anticuerpo diluido en PBS (50 μ l/pocillo) a la placa de ensayo y se incubaron a TA durante 30 minutos. A continuación, se añadieron 50 μ l/pocillo de células en PBS a 6×10^5 células/pocillo a los pocillos que contenían anticuerpo y se incubaron durante otros 60 minutos a 37 °C en una cámara humidificada con un 5% de CO₂. Las placas se lavaron suavemente 2 veces con PBS para eliminar las células no adherentes y se midió la actividad celular en los pocillos añadiendo 200 μ l de una disolución en PBS de 20 μ g/ml de Diacetato de Fluoresceína (Sigma, St. Louis, MO) a cada pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C en una cámara humidificada con un 5% de CO₂ durante 90 minutos y se leyeron mediante el uso de un espectrofotómetro a 490 (Spectra Max 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Ensayo de selectividad del anticuerpo hacia OX40R (ELISA): Se revistieron placas de 96 pocillos Maxisorb (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 100 μ l de proteínas de fusión con miembros de la familia de receptores de TNF α humano a 0,25 μ g/ml diluidas en tampón carbonato BupHTM, pH 9,4 (Pierce, Rockford, IL) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las proteínas de fusión con receptores de selectividad ensayadas incluyeron CD40-Ig (Alexis Biochemicals, San Diego, CA), CD137-Ig (R&D Systems, Minneapolis, MN) y CD271-Ig (Alexis Biochemicals, San Diego, CA). También se incluyó como control positivo con cada ensayo la proteína de fusión OX40-Ig (construcción propia, Bioexpress, 97/2117). Las placas se lavaron después tres veces con tampón de lavado que contenía un 0,05% de Tween 20 (Sigma, St Louis, MO) diluido en PBS y se bloquearon con 300 μ l de un 0,5% de BSA (Sigma, St Louis, MO) en PBS (Sigma, St Louis, MO) durante 1 hora a TA. A continuación, las placas se lavaron y se añadieron 100 μ l/pocillo de anticuerpos reactivos anti-OX40 humano a las placas a diversas concentraciones y se incubaron durante 1 hora a TA. Las placas se lavaron a fondo tres veces y se detectó la unión del anticuerpo hacia OX40R con un anticuerpo anti-cadena kappa humana marcado con peroxidasa de rábano (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) a 25 ng/ml durante 1 hora a TA. Las placas se lavaron después tres veces, lo cual fue seguido por la adición de 100 μ l/pocillo de sustrato 1-Step Turbo-TMB (Pierce, Rockford, IL) durante 30 minutos a TA. La reacción se paró mediante la adición de un volumen igual de H₂SO₄ 2 M. La absorbancia se leyó a 450 nm en un Molecular Devices Spectra Max 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Reactividad cruzada entre especies: Líneas celulares que expresan OX40R: La línea celular 300-19 que expresa una construcción de fusión OX40-CD40 humana recombinante que corresponde a 1-235 de OX40R (dominio extracelular y transmembrana) y 216-278 de CD40 (dominio intracelular) o la proteína OX40R completa de cynomolgus.

Preparación de linfocitos T humanos: Se recogió sangre completa humana en jeringas heparinizadas (Baxter; Deerfield, IL) y después se transfirió inmediatamente a tubos Sigma Accuspin (Sigma, St. Louis, MO) para el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como describió el fabricante. Las PBMC se

lavarón dos veces con DPBS y se aislaron los linfocitos T mediante el uso de una columna de purificación de células T como describió el fabricante (R & D Systems, Minneapolis, MN). Brevemente, las PBMCs se resuspendieron en 2 ml de tampón de columna y se cargaron en una columna de aislamiento de células T pre-lavada. Las PBMCs se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se eluyeron las células T con tampón de columna, se lavaron una vez y se resuspendieron en MCT a 2×10^6 células/ml que consistía en RPMI 1640 (Sigma, St Louis, MO) complementado con un 10% de suero bovino fetal (Hyclone, Logan, UT) y L-glutamina (2 mM), Hepes (10 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (50 µg/ml) (Gibco, Grand Island, NY.). Se añadió un volumen de 2 ml de células T que contenían un anticuerpo anti-CD28 humano a 1 µg/ml (clon 37407, R & D Systems, Minneapolis, MN) a los pocillos de una placa de 24 pocillos pre-revestida con un clon con anticuerpo anti-CD3 humano UCTH1 (R & D Systems, Minneapolis, MN) a 5 µg/ml en PBS. Los cultivos de células T se estimularon durante 3 días antes de analizar la reactividad cruzada de OX40 humano mediante citometría de flujo.

Preparación de PBMCs de cynomolgus: Se obtuvo sangre completa de cynomolgus mediante el uso de tubos Vacutainer heparinizados (BD; Franklin Lakes, NJ) y se diluyó 1:4 en PBS. La sangre completa diluida se mezcló, y se depositaron cuidadosamente en capas 15 ml sobre un volumen igual de Histopaque 1077 (Sigma, St Louis, MO). Los tubos se centrifugaron a 1000 x g durante 45 minutos a TA y la interfase de PBMC mononucleares se recogió, se lavó una vez en PBS y se resuspendió durante 2 minutos a TA con tampón de lisis ACK (Biosource, Rockville, MD) para eliminar las RBCs. Después de un lavado con PBS, las PBMCs se contaron y se reajustaron a 1×10^6 células/ml en medio de cultivo de tejidos (MCT). El MCT consistió en RPMI 1640 (Sigma, St Louis, MO) complementado con un 10% de suero bovino fetal (Hyclone, Logan, UT) y L-glutamina (2 mM), Hepes (10 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (50 µg/ml) adquirida de Gibco (Grand Island, NY). A continuación, se añadieron 2 ml de la preparación de PBMC que contenían un anticuerpo con reactividad cruzada anti-CD28 humano (clon CD28.2, BD Biosciences, San Diego, CA) a los pocillos de una placa de 24 pocillos (Costar, Corning, NY) pre-revestida con un anticuerpo anti-CD3 de mono (clon FN18, Biosource, Camarillo, CA) a 10 µg/ml en PBS. Los cultivos de PBMCs se estimularon durante 4 días antes de analizar la reactividad cruzada de OX40 humano mediante citometría de flujo.

Preparación de PBMCs de conejo: Se extrajo sangre completa de conejo en tubos Vacutainer heparinizados (BD; Franklin Lakes, NJ) y se diluyó inmediatamente 1:3 con HBSS caliente (Gibco, Grand Island, NY). Después de mezclar, se depositaron cuidadosamente en capas 5 ml de la sangre diluida sobre un volumen igual de Lympholyte-Rabbit (Cedarlane Laboratories, Westbury, NY) y se centrifugaron durante 30 minutos a 25 °C. La interfase de PBMC se recogió, se lavó dos veces con PBS y se resuspendió a 2×10^6 células/ml en MCT que contenía PHA a 10 ng/ml (Remel, Lenexa, KS). Las células se cultivaron durante 24-48 horas.

Preparación de PBMCs caninas: Se recogió sangre completa canina mediante el uso de tubos Vacutainer heparinizados (BD; Franklin Lakes, NJ). A continuación, la sangre se mezcló con un volumen igual de HBSS caliente (Gibco, Grand Island, NY). Se depositaron lentamente en capas cuatro ml de sangre diluida sobre 3 ml de Lympholyte-M (Cedarlane Laboratories, Westbury, NY) en tubos cónicos de 15 ml. Los tubos se centrifugaron durante 20 minutos a 800 x g y se recogió la interfase de PBMC, se lavó dos veces con HBSS y se resuspendió en MCT a 2×10^6 células/ml. Se añadieron PBMCs a los pocillos de una placa de 24 pocillos (2 ml/pocillo) y las células se estimularon con 2 µg/ml de ConA (Sigma, St. Louis, MO) durante 48 horas.

Preparación de PBMCs murinas y de rata: La sangre completa de rata recogida en jeringas heparinizadas se diluyó 1:3 en HBSS caliente. A continuación, se depositaron cuidadosamente en capas 5 ml sobre un volumen igual de Lympholyte-Rat (Cedarlane Laboratories, Westbury, NY). Los tubos se centrifugaron durante 20 minutos a 1500 RPM. Se recogió la interfase de PBMCs, se lavó dos veces y el sedimento celular se re-ajustó a 2×10^5 células/ml en MCT. Se añadieron dos ml de células a cada pocillo de una placa de 24 pocillos y se estimularon durante 24-48 horas con PHA (Remel, Lenexa, KS) a 10 ng/ml antes de la tinción de citometría de flujo.

Tinción de citometría de flujo para la reactividad cruzada entre especies: Se usaron PBMCs estimuladas de ratón, rata, conejo, perro y cynomolgus y la línea celular 300-19 que expresa el receptor OX40 de cynomolgus para analizar la reactividad cruzada entre especies del anticuerpo hacia OX40 humano. Se usaron linfocitos T activados que expresaban OX40 humano y células 300-19 transducidas con OX40 como controles positivos. Las células ($5,0 \times 10^5$ células/tubo) se lavaron una vez en tampón de lavado frío (PBS, 2% de FBS y 0,02% de azida sódica) y se añadieron 100 µl/tubo de control conjugado a Alexa Fluor 647 o anticuerpos reactivos hacia OX40 a 5 µg/ml a cada tubo. Los anticuerpos se marcaron mediante el uso de un equipo de marcaje de proteínas Alex Fluor 647 como describió el fabricante (Molecular Probes, Eugene, OR). Las células se incubaron en la oscuridad con anticuerpos con fluorocromo en hielo durante 30 minutos, se lavaron tres veces y se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de lavado para el análisis. Se midió la tinción de anticuerpos y se analizó mediante el uso del programa informático FACSCalibur y CellQuest de Becton Dickinson (San Jose, CA).

Ensayo de actividad de luciferasa: Se prepararon células 293T que contenían el dominio extracelular de OX40 y el dominio intracelular de CD40 fusionados a un indicador de NfκB que contenía luciferasa. Las células se recogieron, se lavaron y se resuspendieron en medio completo sin rojo fenol (DMEM que contenía un 10% de suero bovino fetal, tampón HEPES, aminoácidos no esenciales y L-glutamina) a una densidad de $0,5 \times 10^5$ células/ml. Se colocaron en placas 80 µl de células en cada pocillo de ensayo de una placa de 96 pocillos (PerkinElmer, número de pieza 6005680). Los anticuerpos de ensayo se añadieron a cada pocillo solos o en presencia de un anticuerpo de

entrecruzamiento Fab' anti-IgG humana de cabra (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). La placa se incubó durante la noche a 37 °C. Se añadieron 100 µl de luciferasa (Promega, sistema de ensayo de luciferasa Bright-Glo, nº de cat. E2620) al siguiente día y se midió la cantidad de actividad de luciferasa mediante el uso de un contador de centelleo (TopCount, Packard -NXT).

- 5 Ensayo de αCD3 IL-2 humano: Se recogió sangre completa humana en jeringas heparinizadas (Baxter; Deerfield, IL), se depositó por capas en tubos Accuspin (Sigma; St. Louis, MO) y se centrifugó durante 15 minutos a 2000 rpm. Se recogió la capa leucocitaria, se lavó con PBS (Sigma, St. Louis, MO), y los eritrocitos se lisaron con agua. Las células T se separaron con columnas de enriquecimiento de CD3⁺ humano (R&D Minneapolis, MN), se contaron y se ajustaron a 1 x 10⁶ células/ml en medio RPMI (Gibco; Grand Island, NY) que contenía: 10% de suero bovino fetal (Hyclone; Logan, UT), hepes 10 mM, 1% de penicilina-estreptomina, L-glutamina 2 mM y 0,1 mM de aminoácidos no esenciales (todos de Gibco). Al mismo tiempo, el clon anti-CD3ε humano #UCHT1 (R&D systems, Minneapolis, MN) se colocó a 2,5 µg/ml en PBS en placas de 24 pocillos (Costar; Corning, NY) y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Las placas se lavaron 3x con PBS y se añadió lo siguiente a los pocillos: células T a 1 x 10⁶ células/pocillo, diluciones en serie de anticuerpos hacia OX40 (o control de IgG₂ KLH) y F(ab')₂ anti-Fcγ de IgG humana de cabra para el entrecruzamiento (añadido a 2,5 µg/mL). Los sobrenadantes se extrajeron a las 48 y 72 horas y se determinaron los niveles de IL-2 mediante ELISA (R&D).

- 20 Ensayo de αCD3 IL-2 de cynomolgus: Se recogió sangre completa de mono cynomolgus en tubos heparinizados (BD; Franklin Lakes, NJ), se diluyó 1:4 en PBS, se depositó por capas sobre Histopaque 1077 (Sigma, St Louis, MO) y se centrifugó durante 45 minutos a 2200 rpm. Se recogió la capa leucocitaria, se lavó con PBS, y se lisaron los eritrocitos con agua. Las células se ajustaron a 1 x 10⁶ células/ml y se añadieron a placas de 24 pocillos que se habían pre-revestido durante 2 horas con concentraciones variables de anti-CD3 de mono, clon FN-18 (Biosource; Camarillo, CA) a 37 °C. Se añadieron diluciones en serie de anticuerpo hacia OX40 (o control de IgG₂ KLH), así como F(ab')₂ anti-Fcγ de IgG humana de cabra a 2,5 µg/mL a los pocillos. Los sobrenadantes se recogieron a las 24 y 48 horas y se determinaron los niveles de IL-2 mediante ELISA (Biosource, Camarillo, CA).

- 25 Ensayo de células T sensibilizadas con aloantígeno: Se incubaron células T humanas recién aisladas (véase anteriormente) con células tumorales alogénicas tratadas con mitomicina c (Raji) durante 3-4 días. Después se recogieron las células T, se lavaron, y se dejaron en reposo durante 1 día en medio nuevo antes de estimularlas con 11D4. Se determinó el nivel de IL-2 24 horas más tarde mediante ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN).

B. Procedimientos de estudio *in vivo*

- 30 Modelos de tumores humanos SCID-beige mediante el uso de ratones con injertos de células T y células dendríticas humanas: Se aclimataron ratones SCID-beiges (Taconic #CBSBG-MM) durante 5-7 días después de su llegada, antes del uso. Se usaron las siguientes líneas celulares tumorales: RAJI, ATCC #CCL-86; BT-474, ATCC #HTB-20; PC-3, ATCC#-1435; y LoVo, ATCC# CCL-229.

- 35 Se prepararon linfocitos T purificados (células T) y células dendríticas derivadas de monocitos a partir de sangre humana como sigue: Se recogieron las células mononucleares humanas a partir de sangre heparinizada mediante el uso de tubos Sigma Accuspin #A7054. Las células se recogieron, se colocaron en un matraz T75, y se incubaron durante 3 hrs a 37 °C en un incubador humidificado con un 5% de CO₂. Las células no adherentes se recogieron y se guardaron (véase más adelante). El matraz que contenía las células adherentes se incubó con 20 ml de medio completo RPMI (que contenía un 10% de suero bovino fetal) complementado con IL-4 (R&D) a 10 ng/ml y GM-CSF (R&D) a 100 ng/ml. El cultivo se incubó después durante 6-7 días a 37 °C en un incubador humidificado con un 5% de CO₂. Las células dendríticas derivadas de monocitos no adherentes se recogieron después mediante decantación y lavado del matraz varias veces con medio completo RPMI.

- 45 Las células mononucleares no adherentes iniciales se usaron para purificar células T por medio de selección negativa de afinidad elevada mediante el uso de columnas de enriquecimiento de células T (R&D) según las instrucciones del fabricante. Las células T purificadas se crio-conservan en medio de cultivo celular de recuperación a 10⁷ células/ml y se almacenan en nitrógeno líquido hasta su uso. Las células tumorales (1 x 10⁷) se inyectaron de manera subcutánea (SC) con células T (1 x 10⁶) y células dendríticas derivadas de monocitos (5 x 10⁵) del mismo donante, a 0,2 mL/ratón. Se monitorizó el crecimiento tumoral a lo largo del tiempo con un calibre.

C. Resultados para el anticuerpo 11D4

- 50 (1) Estudios *in vitro*:

Ciertas propiedades del anticuerpo 11D4 de los estudios *in vitro* se resumen en la Tabla 3.

El anticuerpo 11D4 se une al OX40R con afinidad elevada.

- 55 Esto se demostró mediante el uso de una proteína de fusión de IgG1 que contenía el dominio extracelular del OX40R y en células completas (células transfectadas OX40R+ y células T primarias activadas). En los ejemplos que usan la proteína de fusión de IgG1, 11D4 se unió al dominio extracelular del OX40R con una CE₅₀ de 0,5 +/- 0,18 µg/mL (3,5 nM). Esta unión se confirmó en células pre-B 300-19 que expresaban el dominio extracelular de longitud

completa del OX40R (no se observó unión en las células 300-19 originarias). La CE_{50} para la unión a células transfectadas con OX40R fue $0,2 \pm 0,16 \mu\text{g/mL}$ ($1,7 \text{ nM}$). Para confirmar que la unión se observó en células T primarias, se aislaron células T de sangre periférica de múltiples donantes humanos y se estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 durante 2 días para aumentar la expresión del OX40R. Los datos de unión de saturación en estas células T indicaron que 11D4 se une con una CE_{50} de $0,6 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$ ($4,0 \text{ nM}$, $N = 17$ donantes). Estos datos demuestran que 11D4 se une con avidez al OX40R.

Para caracterizar adicionalmente esta unión, se recogieron datos para determinar la región del dominio extracelular del OX40R en la que interacciona 11D4, y también para determinar si el receptor fue transportado al interior tras la unión. Los datos de unión competitiva a la proteína de fusión OX40R-IgG1 indicaron que 11D4 compite por la unión con las células que expresan el ligando OX40, lo que proporciona pruebas de que 11D4 interacciona en la región de unión al ligando del receptor. Además, 11D4 no compite de manera cruzada con dos anticuerpos hacia OX40R disponibles comercialmente, BerAct35 y L106, por la unión a células T tal como se determina mediante análisis FACS. El análisis FACS mediante el uso de anticuerpos de detección no competitivos indicó que el OX40R no se transportó al interior tras la pre-incubación de células T primarias activadas con 11D4 durante 30 minutos. Su afinidad de unión, determinada mediante análisis Biacore con el uso de la proteína de fusión del dominio extracelular de OX40R como ligando inmovilizado, indicó que la constante de disociación en equilibrio (KD) de 11D4 para la unión fue $0,48 \text{ nM}$. Estos análisis también estimaron que la constante de velocidad de disociación (kd) de 11D4 fue de $5,72 \text{ E-}05 \text{ 1/s}$. Por lo tanto, 11D4 se une con una afinidad elevada a la región de unión al ligando del OX40R, tiene una constante de disociación lenta, y no transporta al interior el receptor tras la unión.

El anticuerpo 11D4 se une selectivamente al OX40R.

La selectividad de 11D4 por el OX40R se determinó frente a otros miembros de la superfamilia de TNFR mediante el uso de datos relacionados con las construcciones de proteínas de fusión de IgG1 que contienen el dominio extracelular respectivo del receptor relacionado. Estos receptores incluyeron el receptor CD40, el receptor 4-1BB (CD137) y el receptor del factor de crecimiento neuronal (CD271). En todos los casos, no se observó una unión significativa a concentraciones de hasta $100 \mu\text{g/mL}$ (700 nM) en estos receptores. Cuando se comparó con la unión observada a la proteína de fusión de OX40R ($CE_{50} = 0,5 \mu\text{g/mL}$), estos datos demuestran que 11D4 es >100 veces selectivo para OX40R frente a otros miembros de la familia relacionados analizados. (Véanse las Figuras 1a y 1b).

Actividad funcional del anticuerpo 11D4:

La actividad funcional de 11D4 se demostró tanto en células transfectadas OX40R+ como en células T primarias. En estos ensayos, 11D4 demostró una actividad agonista cuando se añadió a las células con o sin un anticuerpo secundario, $F(ab')_2$ anti-Fc γ de IgG humana de cabra.

En el primer grupo de experimentos, se determinó la actividad agonista de 11D4 mediante el uso de células 293 transfectadas con el dominio extracelular y transmembrana del OX40R fusionado al dominio intracelular de CD40 con un indicador de luciferasa con NF κ B. En este ensayo, 11D4 aumentó la señalización a través del OX40R con una CE_{50} media de $0,33 \mu\text{g/mL}$ ($2,2 \text{ nM}$, $N = 4$). Se muestra una curva concentración-respuesta representativa para la inducción de luciferasa por 11D4 en la Figura 2. En ausencia del anticuerpo secundario $F(ab')_2$, la magnitud de la actividad de luciferasa se redujo 4 veces junto con la CE_{50} .

Como prueba adicional de la actividad agonista de 11D4, se generaron células T específicas del antígeno. Se incubaron células T humanas recién aisladas con células tumorales alogénicas tratadas con mitomicina c (Raji) durante 3-4 días. Después se recogieron las células T, se lavaron, y se dejaron en reposo durante 1 día en medio nuevo antes de estimularlas con 11D4. El análisis FACS indicó un nivel elevado de expresión de OX40R en estas células incluso después del reposo. 11D4 indujo niveles elevados de IL-2 en estas células, que en algunos casos superaron 100 ng/mL (Figura 3). La CE_{50} media para esta respuesta de 2 ejemplos distintos fue $0,008 \pm 0,006 \mu\text{g/mL}$. En ausencia de 11D4, solamente se secretaron niveles mínimos de IL-2 en estas células.

11D4 también aumenta la producción de IL-2 por las células T humanas primarias estimuladas mediante anti-CD3. Aunque la proporción señal-ruido en este ensayo fue baja en ciertos ensayos debido a la inducción de IL-2 mediante anti-CD3 solo, 11D4 aumentó la producción de IL-2 cuando se añadió con $F(ab')_2$ anti-Fc γ de IgG humana de cabra. No se observó actividad para 11D4 en células T recién aisladas en ausencia de anti-CD3. La magnitud del aumento de IL-2 mediante 11D4 osciló de 2,3 a 57 veces frente a anti-CD3 solo dependiendo del donante y de la cantidad de IL-2 generada por anti-CD3. El efecto de 11D4 sobre la producción de IL-2 por las células T humanas primarias estimuladas con $2,5 \mu\text{g/mL}$ de anti-CD3 se representa en la Figura 4 (mediante el uso de una curva de concentraciones de 8 puntos con diluciones 1:3). La CE_{50} media calculada a partir de esos datos que usaron las curvas concentración-respuesta de 8 puntos fue $0,042 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ (véase la Tabla 4).

La actividad funcional de 11D4 sobre la producción de IL-2 se ensayó también mediante el uso de células de mono estimuladas con anti-CD3 y 11D4 (junto con el anticuerpo secundario $F(ab')_2$). Los resultados se representan en la Figura 5 y en la Tabla 5. Estos datos indicaron que la CE_{50} para 11D4 fue similar entre las células de mono y humanas ($0,022$ frente a $0,042 \mu\text{g/mL}$ para las células humanas), pero la magnitud de la IL-2 inducida por encima de la de anti-CD3 solo fue significativamente menor con el uso de células T de Cynomolgus (aprox. 35 veces, $5762 \pm$

4748 pg/mL de IL-2 para las células humanas (N = 21) frente a 261 +/- 294 pg/mL de IL-2 para las células de mono (N = 9).

Reactividad cruzada entre especies:

Se determinó la capacidad de 11D4 de unirse a células T de múltiples especies. Se aislaron células T de ratón, rata, conejo, perro, y mono y se activaron con anti-CD3 más anti-CD28 o mitógeno. No se observó unión a células de ratón, rata, conejo o perro tal como se indica mediante análisis FACS. La ausencia de unión a OX40R de ratón también se confirmó mediante ELISA con el uso de una proteína de fusión disponible comercialmente que contenía el dominio extracelular del OX40R murino. En contraste, 11D4 se une a células T de mono *Cynomolgus* tal como se determinó en un ensayo de unión de saturación mediante FACS. El intervalo de valores de CE_{50} obtenidos mediante el uso de diferentes monos se muestra en la Figura 6. Como comparación, el intervalo de valores de CE_{50} obtenidos mediante el uso de células humanas se muestra en la Figura 7. Aunque variable, el intervalo de valores de CE_{50} fue similar entre células de mono y humanas (los valores medios son 0,354 µg/mL para células de mono frente a 0,566 µg/mL para células humanas).

(2) Estudios *in vivo*:

La ausencia de reactividad cruzada de 11D4 con el OX40R murino requirió el desarrollo de un modelo de tumor xenogénico con el uso de ratones beiges con inmunodeficiencia combinada grave (SCID). Los ratones SCID-beiges carecen de linfocitos T y B murinos y células NK, lo que les hace receptores ideales para el injerto de células inmunitarias humanas y el crecimiento de tumores humanos. Se ensayaron cuatro líneas celulares tumorales que representan diversos tipos de tumores en este modelo *in vivo*. Ninguna de las líneas tumorales expresaron OX40R. En todos los casos, las células tumorales (1×10^7) se inyectaron de manera subcutánea (SC) con células T (1×10^6) y células dendríticas derivadas de monocitos (5×10^5) del mismo donante. El 11D4 administrado mediante inyección intraperitoneal (IP) inhibió el crecimiento tumoral hasta en un 98% en estos modelos como se resume en la Tabla 6. La vía de administración IP se eligió para 11D4 debido a su facilidad de administración y diseminación rápida hacia la sangre periférica.

Eficacia de 11D4 contra un linfoma de células B en ratones SCID-beiges:

Se inyectó SC a ratones SCID-beiges el linfoma de células B de Burkitt, Raji, junto con células T humanas y células dendríticas derivadas de monocitos. Los ratones recibieron una única inyección IP de 11D4 o un anticuerpo de control de isotipo (IgG2 anti-KLH) en el momento de la inyección del tumor. Como se muestra en la Figura 8, 11D4 disminuyó la velocidad de crecimiento tumoral en los animales tratados. El tamaño del tumor en cada animal individual (N = 10) en el día 21 tras la exposición se muestra en la Figura 9, que ilustra una inhibición del 64% del crecimiento tumoral con un nivel de dosis de 10 mg/kg. No se observó actividad en ausencia de células T y células dendríticas.

Eficacia de 11D4 en un modelo de tumor de próstata:

Se inyectó SC a ratones SCID-beiges el adenocarcinoma de próstata PC-3 junto con células T humanas y células dendríticas derivadas de monocitos. Los ratones recibieron una única inyección IP de 11D4 o un anticuerpo de control de isotipo (IgG2 anti-KLH) en el momento de la inyección del tumor. Los resultados, que se representan en la Figura 10, muestran que el tratamiento con 11D4 dio como resultado una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento tumoral. El tamaño de los tumores en cada animal individual (N = 10) de este estudio en el día 27 tras la exposición se muestra en la Figura 11, que ilustra una inhibición del 70% del crecimiento tumoral cuando se administró a los animales una única inyección de 1,0 mg/kg de 11D4, y una inhibición del 90% a una dosis de 10 mg/kg. Los niveles plasmáticos de 11D4 determinados en el día 27 en estos animales fueron 6,2 µg/mL al nivel de dosis de 1,0 mg/kg.

Eficacia de 11D4 en un modelo de tumor de carcinoma de colon:

Se inyectó SC a ratones SCID-beiges el adenocarcinoma colorrectal LoVo junto con linfocitos T humanos y células dendríticas derivadas de monocitos autólogos. Los ratones recibieron una única inyección IP de 11D4 o un anticuerpo de control (IgG2 anti-KLH) en el momento de la inyección del tumor. Los resultados, que se representan en la Figura 12, demuestran que la dosis de 11D4 disminuyó de manera dependiente el crecimiento tumoral en estos animales. El tamaño de los tumores en cada animal individual (N = 10) de este estudio en el día 27 tras la exposición se muestra en la Figura 13, que ilustra una inhibición del 64 % del crecimiento tumoral mediante el uso de una única dosis de 1,0 mg/kg y una inhibición del 87 % del crecimiento tumoral a un nivel de dosis de 10,0 mg/kg.

Eficacia de 11D4 en un modelo de tumor de carcinoma mamario

Se inyectó SC a ratones SCID-beiges el carcinoma mamario BT474 junto con linfocitos T humanos y células dendríticas derivadas de monocitos autólogos. Los ratones recibieron dos inyecciones (IP) de 11D4 o un anticuerpo de control (IgG2 anti-KLH) en el momento de la inyección del tumor y de nuevo 30 días más tarde. Los resultados, que se representan en la Figura 14, demuestran que 11D4 disminuyó el crecimiento tumoral en estos animales. El tamaño de los tumores en cada animal individual (N = 10) de este estudio en el día 85 tras la exposición se muestra

en la Figura 15 que ilustra una inhibición del 98% del crecimiento tumoral a un nivel de dosis de 10,0 mg/kg y una inhibición del 85% a una dosis de 1 mg/kg.

D. Resultados para el anticuerpo 18D8

(1) Estudios *in vitro*:

- 5 Los resultados de los estudios *in vitro* para el anticuerpo 18D8 se resumen en la Tabla 7.

El efecto del anticuerpo 18D8 sobre la producción de IL-2 inducida por anti-CD3 por las células T humanas primarias de diferentes donantes también se muestra en la Tabla 8.

(2) Estudios *in vivo*:

Eficacia de 18D8 contra el linfoma de células B en un modelo de ratones SCID-beiges

- 10 Se inyectó SC a ratones SCID-beiges el linfoma de células B de Burkitt, Raji, junto con linfocitos T humanos y células dendríticas derivadas de monocitos autólogos. Los ratones recibieron una única inyección IP de 18D8 o un anticuerpo de control de isotipo (IgG2 anti-KLH) en el momento de la inyección del tumor. Se usaron diez animales por grupo en cada estudio. Los resultados de dos estudios se presentan en la Tabla 9. Los resultados demuestran que 18D8 produjo una eficacia anti-tumoral significativa a las dosis de 1,0 mg/kg y 10 mg/kg. No se observó actividad en ausencia de células T y células dendríticas, lo que sugiere que este efecto anti-tumoral puede estar mediado por el sistema inmunitario.

Eficacia de 18D8 contra el tumor de próstata en un modelo de ratones SCID-beiges

- 20 Se inyectó SC a ratones SCID-beiges el adenocarcinoma de próstata PC-3 junto con células T humanas y células dendríticas derivadas de monocitos autólogos. Los ratones recibieron una única inyección IP de 18D8 o un anticuerpo de control de isotipo (IgG2 anti-KLH) en el momento de la inyección del tumor. Se usaron diez animales por grupo en el estudio. Los resultados se presentan en la Tabla 9. Los resultados demuestran que el tratamiento con 18D8 dio como resultado una inhibición del 42%, 90%, y 88% del crecimiento tumoral a las dosis de 0,1 mg/kg, 1,0 mg/kg, y 10 mg/kg, respectivamente.

Información de depósito

- 25 Los solicitantes han depositado un cultivo de *E. coli* DHa5 que contiene un plásmido que codifica la cadena pesada del anticuerpo 11D4 y un cultivo de *E. coli* DHa5 que contiene un plásmido que codifica la cadena ligera del anticuerpo 11D4 en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, el 10 de julio de 2007, a los que se les han asignado los números de depósito PTA-8524 y PTA-8525, respectivamente. Estos depósitos se hicieron en virtud de las estipulaciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes y las normas allí expuestas (Tratado de Budapest). Estos depósitos se mantendrán sin limitación en el almacén de la ATCC durante un periodo de 30 años, o 5 años después de la petición más reciente, o durante la vida eficaz de la patente, lo que sea más largo, y se sustituirá si los depósitos dejan de ser viables durante ese periodo. La disponibilidad de los materiales depositados no se debe considerar como una licencia para poner en práctica la invención en contravención de los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

Tabla 1. Identificadores de secuencia para los anticuerpos 11D4 y 18D8

SEQ ID N°:	Anticuerpo	Secuencia
1	11D4	Aminoácidos de CDR1 de V _H
2	11D4	Aminoácidos de CDR2 de V _H
3	11D4	Aminoácidos de CDR3 de V _H
4	11D4	Aminoácidos de CDR1 de V _L
5	11D4	Aminoácidos de CDR2 de V _L
6	11D4	Aminoácidos de CDR3 de V _L
7	11D4	Aminoácidos de V _H
8	11D4	Aminoácidos de V _L

9	11D4	Aminoácidos de la Cadena Pesada
10	11D4	Aminoácidos de la Cadena Ligera
11	11D4	Ácido Nucleico de V _H
12	11D4	Ácido Nucleico de V _L
13	18D8	Aminoácidos de CDR1 de V _H
14	18D8	Aminoácidos de CDR2 de V _H
15	18D8	Aminoácidos de CDR3 de V _H
16	18D8	Aminoácidos de CDR1 de V _L
17	18D8	Aminoácidos de CDR2 de V _L
18	18D8	Aminoácidos de CDR3 de V _L
19	18D8	Aminoácidos de V _H
20	18D8	Aminoácidos de V _L
21	18D8	Aminoácidos de la Cadena Pesada
22	18D8	Aminoácidos de la Cadena Ligera
23	18D8	Ácido Nucleico de V _H
24	18D8	Ácido Nucleico de V _L

Tabla 2A. Secuencias de aminoácidos para el anticuerpo 11D4

DESCRIPCIÓN	SECUENCIA
	(Región variable en mayúsculas, región constante en minúsculas, CDRs subrayadas)
Cadena Pesada	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAP GKGLEWVSYISSSSTIDYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMN SLRDEDTAVYYCARESGWYLF ⁺ FDYWGQGT ⁺ LVTVSSastkgpsvfpl apcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpav ⁺ lqssgylsslsvtvpssnfg tqytcnvdhkp ⁺ sntkvdktverkccvecppcpappvagpsvflfppkpkdtlmisrtpevtc vvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwlngkeykc kvsnkglpapiektisktkgqprepvytlppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesn gqpennyktpmldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealnhhtqkslsisp k
Cadena Ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLA ⁺ WYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS ⁺ SLQPEDFATY YCQQYNSYPPTFGGGTKVEIKrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnfy preakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsdstylsstltlskadyekhkvyacevthqglss pvtksfnrgec

Tabla 2B. Secuencias de aminoácidos para el anticuerpo 18D8

DESCRIPCIÓN	SECUENCIA
	(Región variable en mayúsculas, región constante en minúsculas, CDRs subrayadas)
Cadena Pesada	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAP GKGLEWVSGISWNSGSGIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTALYYCAKDQSTADYYFYGMDEVWGQGTITVTVS Sastkgpsvfplapcsrcstsestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglysl ssvvtvpssnfgtqytncvndhkpsntkvdktkverkcvecppcpappvagpsvflfppkpk dtlmsrtpevtcvvvdvshdepvqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvh qdwlngkeykckvsnkglpapiektisktkgqprepvytlppsreemtknqvslclvkgf ypsdiavewesngqpennykttppmlsdsgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealh nhytqkslslspgk
Cadena Ligera	EIVVTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYY CQQRSNWPTFGQGTKVEIKrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypre akvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsdstylstltlskadyekhkvyacevthqglsspt ksfnrgec

Tabla 3. Resumen de ciertas propiedades *in vitro* del anticuerpo 11D4

Parámetro	Actividad $\mu\text{g/ml}$	(nM)
Afinidad por OX40R: (Biacore)		
K_D	0,07	0,48
Velocidad de disociación (kd)		5,7E-05 1/s
Unión a OX40R:		
Dominio extracelular de la proteína de fusión	0,5 +/- 0,18	3,50
Unión de saturación (CE_{50}):		
Células T estimuladas con CD3/CD28 (N = 17)	0,6 +/- 1,00	4,00
Células 300-19 OX40R+ (N = 5)	0,2 +/- 0,16	1,70
Estimulación <i>in vitro</i> de células transfectadas OX40R+ (luciferasa) (CE_{50} ; N = 4)	0,33 +/- 0,22	2,20
Aumento de la actividad de células T:		
- Producción de IL-2 inducida por CD3 (N = 12)	0,042 +/- 0,01	0,30

- Estimulación de la producción de IL-2 por células sensibilizadas con antígeno (N = 2)	0,008 +/- 0,006	0,04
Selectividad (unión) (CD40, CD137, CD271)	> 100 µg/mL	>700,00

Los valores representan la media +/- una DE

Tabla 4. Efecto del anticuerpo 11D4 sobre la producción de IL-2 inducida por anti-CD3 por células T humanas primarias

CE ₅₀ (µg/mL)	IL-2 Max (pg/mL)	CEmax (µg/mL)	Índice de Estimulación	Donante
0,008	4831	0,05	3,8	1
0,011	5450	0,05	2,6	2
0,014	6571	0,5	2,3	3
0,014	7271	0,05	5,9	4
0,011	6313	0,05	9,1	5
ND	ND	ND	7,0	6
0,010	1006	0,05	4,8	7
ND	ND	ND	5,9	8
ND	ND	ND	25,4	9
ND	ND	ND	57,0	10
ND	ND	ND	8,3	11
ND	ND	ND	5,1	12
ND	ND	ND	2,7	13
ND	ND	ND	4,6	14
0,014	4687	0,05	6,0	15
0,014	3012	0,05	35,2	16
ND	ND	ND	21,4	17
0,029	2796	0,125	3,8	18
0,052	1718	0,125	5,5	19
0,020	14190	0,56	16,8	20
0,068	1611	1,67	7,9	21

IL-2 Max: Cantidad de IL-2 producida con 11D4 a la CEmax con anti-CD3 solo

CEmax: Concentración de 11D4 que produce el nivel máximo de IL-2 con anti-CD3 solo

Índice de Estimulación: Proporción del nivel máximo de IL-2 producido con 11D4 frente a la cantidad de IL-2 producida con anti-CD3 solo

ND = no determinado.

Los valores para los últimos cuatro donantes (18-21) son de la curva dosis-respuesta hecha en diluciones 1:3 ó 1:4 de 8 puntos; todos los demás valores representan curvas de dilución logarítmica. La CE_{50} de las curvas de concentración 1:3 y 1:4 fue 0,042 +/- 0,01 ug/mL, N = 4.

Tabla 5. Efecto del anticuerpo 11D4 sobre la producción de IL-2 inducida por anti-CD3 por células T de cynomolgus

CE_{50} (μ g/mL)	IL-2 Max Inducida (pg/mL)	CE_{max} (μ g/mL)	Índice de Estimulación	Donante
0,007	376	0,05	3,5x	32750
0,002	116	0,05	2,2x	2325
ND	ND	ND	2,0x	32405
0,007	167	0,05	34,4	32081
0,011	978	0,005	5,6x	32842
ND	ND	ND	6,3x	2325
0,008	40	0,021	2,7x	33081
0,031	168	0,062	5,0x	33080
0,028	128	0,062	3,8x	33062

IL-2 Max: Cantidad de IL-2 producida con 11D4 a la CE_{max} con anti-CD3 solo

CE_{max} : Concentración de 11D4 que produce el nivel máximo de IL-2 con anti-CD3 solo

Índice de Estimulación: Proporción de IL-2 máxima producida con 11D4 sobre la cantidad producida con anti-CD3 solo

ND = no determinado

Los valores para los últimos tres donantes (33081, 33080, y 33062) en la Tabla 6 son de una curva dosis-respuesta hecha en diluciones 1:3 de 8 puntos. Todos los demás valores representan curvas de diluciones logarítmicas. La CE_{50} derivada de esas curvas mediante el uso de diluciones 1:3 fue 0,022 +/- 0,01; N = 3.

Tabla 6. Inhibición del crecimiento de tumores humanos mediante el anticuerpo 11D4 en ratones SCID-beiges a los que se les inyectaron células T y células dendríticas humanas

Tipo de Tumor	Dosificación de 11D4	Duración del estudio	10 mg/kg	1,0 mg/kg	0,1 mg/kg	0,01 mg/kg
Raji: linfoma de células B	Día 1	21 días	64%	42%	27%	nd
Raji: linfoma de células B	Día 1	21 días	nd	75%	42%	8%
Lovo: carcinoma de colon	Día 1	25 días	76%	44%	20%	nd
Lovo: carcinoma de colon	Día 1	25 días	87%	64%	15%	nd
PC3: próstata	Día 1	27 días	90%	77%	45%	nd
PC3: próstata	Día 1	27 días	90%	70%	50%	nd
BT474: mama	Día 1 y 30	85 días	98%	85%	46%	nd

Valores = % de inhibición del crecimiento tumoral determinado al final del estudio

nd = no detectado

Tabla 7. Resultados de los estudios *in vitro* con el anticuerpo 18D8

Parámetro	Actividad	
	µg/ml	(nM)
Afinidad por OX40R (Biacore):		
K _D	0,49	3,38
Velocidad de disociación (kd)		2,9E-04 1 /s
Unión a OX40R (CE ₅₀):		
-Dominio extracelular de la proteína de fusión	0,034 +/- 0,01	0,23
-Unión de saturación:		
Células T estimuladas con CD3/CD28 (N = 4)	1,06 +/- 0,51	7,30
Células 300-19 OX40R+ (N=2)	0,24 +/- 0,09	1,66
Aumento de la Actividad de Células T (CE ₅₀):		
- Producción de IL-2 inducida por CD3 (N = 4)	0,049 +/- 0,06	0,33
- Estimulación de la producción de IL-2 por células sensibilizadas con antígeno (N = 1)	0,014 +/- 0	0,10
Selectividad (Unión a CD40, CD137, CD271):	> 100 µg/mL	>700,00

Los valores de actividad expresados en µg/ml representan la media +/- una DE.

TABLA 8. Efecto del Anticuerpo 18D8 sobre la Producción de IL-2 Inducida por Anti-CD3 por Células T Humanas Primarias

CE ₅₀ (µg/mL)	IL-2 Max (pg/mL)	CEmax (µg/mL)	Índice de Estimulación	Donante
0,013	1120	0,05	13,7	LC
0,024	4334	0,5	5,1	TH
0,024	2280	0,5	5,4	KO
0,135	1356	0,5	2,4	RN

IL-2 Max: Cantidad de IL-2 producida con 18D8 a la CEmax con anti-CD3 solo

CEmax: Concentración de 18D8 que produce el nivel máximo de IL-2 con anti-CD3 solo

Índice de Estimulación: Proporción de IL-2 máxima producida con 18D8 sobre la cantidad producida con anti-CD3 solo

Los valores representan las curvas de diluciones logarítmicas.

Tabla 9. Inhibición del crecimiento de tumores humanos mediante el anticuerpo 18D8 en ratones SCID-beiges

Tipo de Tumor	Dosificación de 18D8	Duración del estudio	Nivel de Dosis de 18D8 (mg/kg)			
			10	1.0	0.1	0.01
Raji: linfoma de células B	Día 1	23 días	73%	73%	11%	nd
Raji: linfoma de células B	Día 1	24 días	54%	59%	nd	nd
PC3: próstata	Día 1	24 días	88%	90%	42%	nd

Valores = % de inhibición del crecimiento tumoral determinado al final del estudio

nd = no determinado

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Pfizer Inc. y Medarex Inc.
 <120> Moléculas de unión al receptor OX40 humano
 <130> PC33601
 10 <160> 24
 <170> PatentIn versión 3.5
 15 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Humano
 20 <400> 1
 Ser Tyr Ser Met Asn
 1 5
 25 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Humano
 30 <400> 2
 Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 35 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 3
 Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr
 1 5
 40 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 45 <213> Humano

<400> 4
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10
 5 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 5
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 10 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Humano
 <400> 6
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
 1 5
 20 <210> 7
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Humano
 25 <400> 7
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 30 <210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 8
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 35 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

ES 2 526 887 T3

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 9

<211> 444

<212> PRT

<213> Humano

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

ES 2 526 887 T3

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

5 <210> 10
 <211> 214
 <212> PRT

ES 2 526 887 T3

<213> Humano

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 11

<211> 354

<212> DNA

<213> Humano

<400> 11

gagggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	cggggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	caccttcagt	agctatagca	tgaactgggt	ccgccaggct	120
ccaggaagg	ggctggagt	ggtttcatac	attagtagta	gtagtagtac	catagactac	180
gcagactctg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	atgccaagaa	ctcactgtat	240
ctgcaaata	acagcctgag	agacgaggac	acggctgtgt	attattgtgc	gagagaaagc	300
ggctggtacc	tctttgacta	ctggggccag	ggaaccctgg	tcaccgtctc	ctca	354

<210> 12
 <211> 321
 <212> DNA
 5 <213> Humano

 <400> 12
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgct gggcgagtc gggtagtagc agctggtag cctggtagc gcagaaacca 120
 gagaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctccac ttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

 10 <210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Humano

 15 <400> 13
 Asp Tyr Ala Met His
 1 5

 <210> 14
 <211> 17
 20 <212> PRT
 <213> Humano

 <400> 14
 Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 Gly
 25
 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Humano

 30 <400> 15
 Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

 <210> 16
 35 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Humano

 <400> 16
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 40 1 5 10

 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 45 <213> Humano

 <400> 17
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> Humano
 <400> 18
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
 1 5
 10 <210> 19
 <211> 124
 <212> PRT
 15 <213> Humano
 <400> 19
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 20 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 20
 <211> 106
 <212> PRT
 25 <213> Humano
 <400> 20

ES 2 526 887 T3

Glu Ile Val Val Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 21

<211> 450

5 <212> PRT

<213> Humano

<400> 21

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

10 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

ES 2 526 887 T3

35	40	45
Ser Gly Ile Ser Trp Asn	Ser Gly Ser Ile Gly Tyr	Ala Asp Ser Val
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile	Ser Arg Asp Asn Ala	Lys Asn Ser Leu Tyr
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp	Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85	90	95
Ala Lys Asp Gln Ser Thr	Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr	Gly Met Asp
100	105	110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr	Val Thr Val Ser Ser	Ala Ser Thr Lys
115	120	125
Gly Pro Ser Val Phe Pro	Leu Ala Pro Cys Ser	Arg Ser Thr Ser Glu
130	135	140
Ser Thr Ala Ala Leu Gly	Cys Leu Val Lys Asp	Tyr Phe Pro Glu Pro
145	150	155
Val Thr Val Ser Trp Asn	Ser Gly Ala Leu Thr	Ser Gly Val His Thr
165	170	175
Phe Pro Ala Val Leu Gln	Ser Ser Gly Leu Tyr	Ser Leu Ser Ser Val
180	185	190
Val Thr Val Pro Ser Ser	Asn Phe Gly Thr Gln Thr	Tyr Thr Cys Asn
195	200	205
Val Asp His Lys Pro Ser	Asn Thr Lys Val Asp	Lys Thr Val Glu Arg
210	215	220
Lys Cys Cys Val Glu Cys	Pro Pro Cys Pro Ala	Pro Pro Val Ala Gly
225	230	235
Pro Ser Val Phe Leu Phe	Pro Pro Lys Pro Lys	Asp Thr Leu Met Ile
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val	Thr Cys Val Val Val	Asp Val Ser His Glu
260	265	270
Asp Pro Glu Val Gln Phe	Asn Trp Tyr Val Asp	Gly Val Glu Val His
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro	Arg Glu Glu Gln Phe	Asn Ser Thr Phe Arg
290	295	300

ES 2 526 887 T3

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 22
<211> 213
<212> PRT
<213> Humano

<400> 22

Glu Ile Val Val Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

ES 2 526 887 T3

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
85 90
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205
Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 23
<211> 372
5 <212> DNA
<213> Humano

<400> 23

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggct cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcc a tgcactgggt ccggcaagct 120
ccaggggaagg gcctggaatg ggtctcagggt attagttgga atagtggtag cataggctat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaataa acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagatcag 300
agtacagctg attactactt ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
10 accgtctcct ca 372

<210> 24
<211> 318
15 <212> DNA
<213> Humano

<400> 24

gaaattgtgg tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120

20

ES 2 526 887 T3

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgacgtt cggccaaggg	300
accaaggtgg aaatcaaa	318

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una molécula de unión aislada que se une a OX40R humano, y el método comprende expresar una secuencia de aminoácidos de la molécula de unión en una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos de la molécula de unión, en el que la molécula de unión comprende:
 - A. (a) una CDR1 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1; (b) una CDR2 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 2; (c) una CDR3 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 3; (d) una CDR1 de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 4; (e) una CDR2 de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 5; y (f) una CDR3 de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 6; o
 - B. (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 7; y (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 8; o
 - C. (a) una CDR1 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 13; (b) una CDR2 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 14; (c) una CDR3 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 15; (d) una CDR1 de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 16; (e) una CDR2 de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 17; y (f) una CDR3 de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 18; o
 - D. (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 19; y (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 20.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la molécula de unión: (a) se une al OX40R humano con una K_D de 1×10^{-6} M o menos; y (b) tiene actividad agonista sobre el OX40R humano.
3. El método según la reivindicación 1, en el que la molécula de unión es un anticuerpo humano.
4. El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la molécula de unión es un anticuerpo quimérico o humanizado.
5. El método según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo se une a OX40R humano con una K_D de 100 nM o menos.
6. Un método para producir un anticuerpo monoclonal aislado que se une a OX40R humano, y el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un vector de expresión que comprende ADN que codifica el anticuerpo monoclonal, en el que el anticuerpo monoclonal comprende:
 - (i) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 10; o que comprende
 - (ii) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 21 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 22.

Figura 1a.

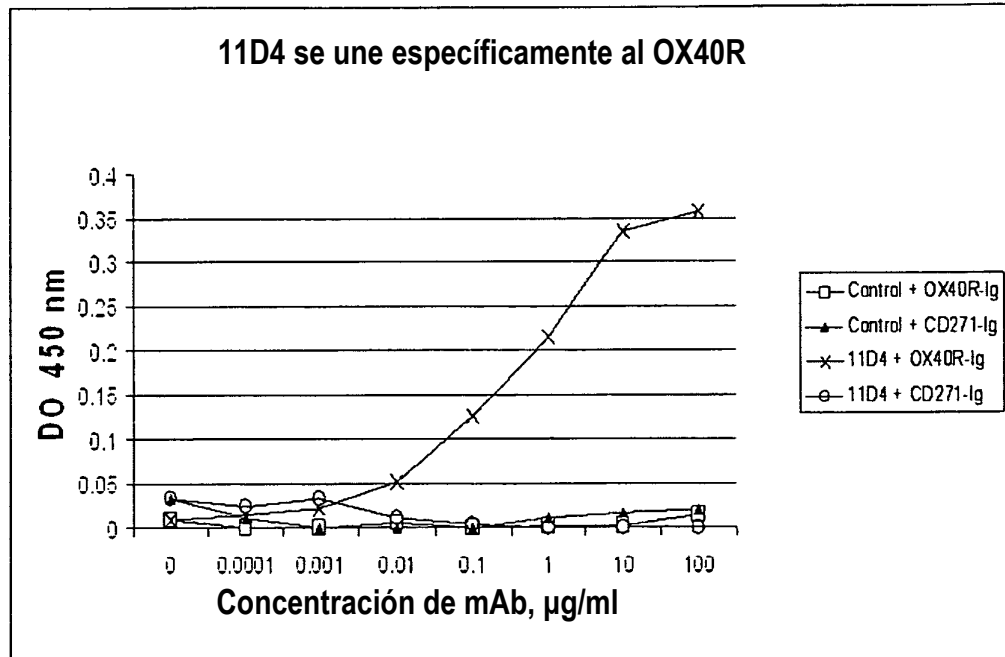


Figura 1b.

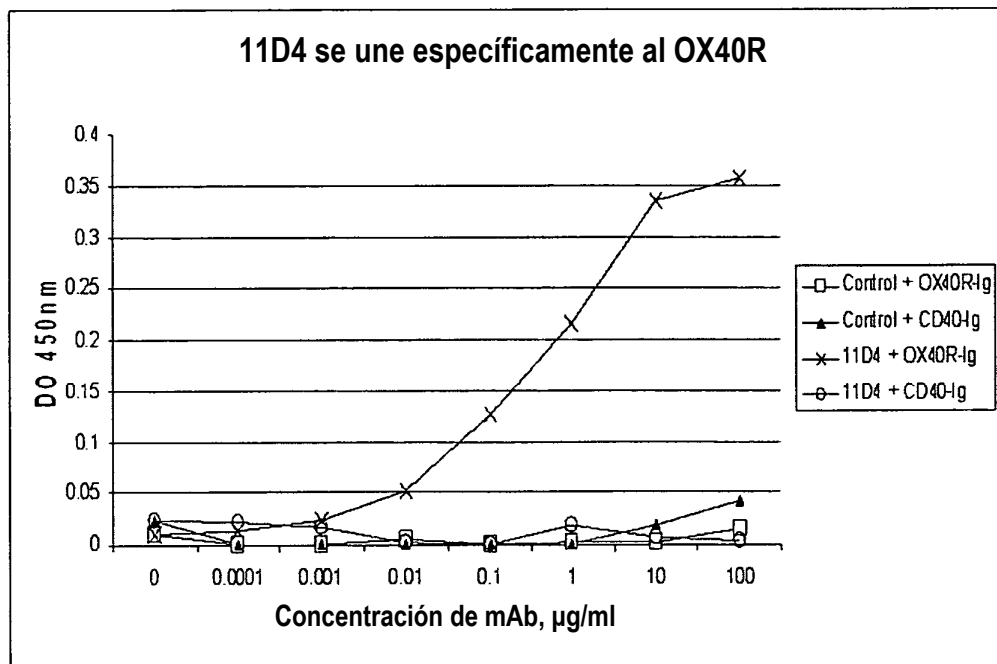


Figura 2.

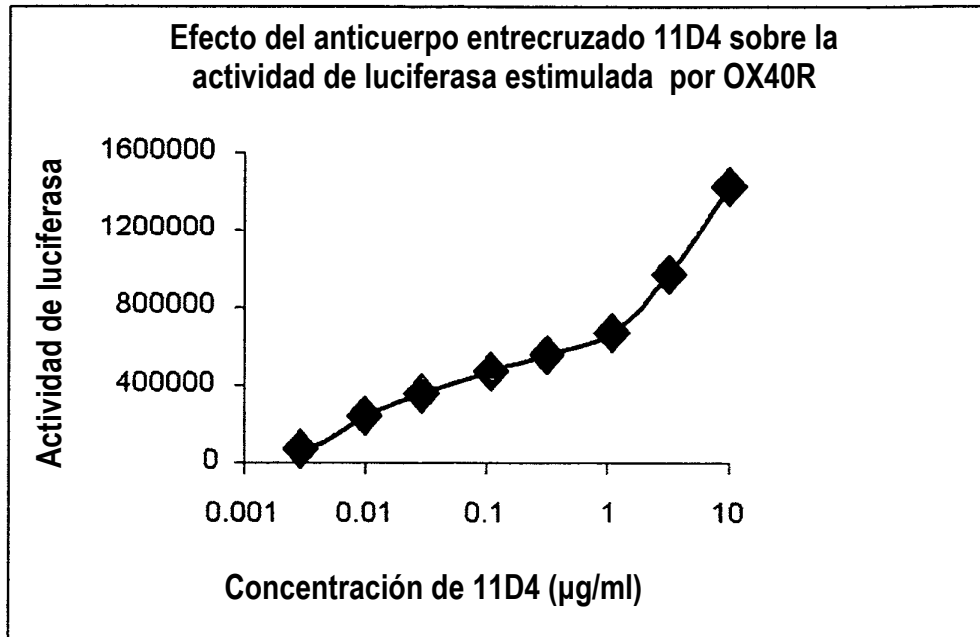


Figura 3.

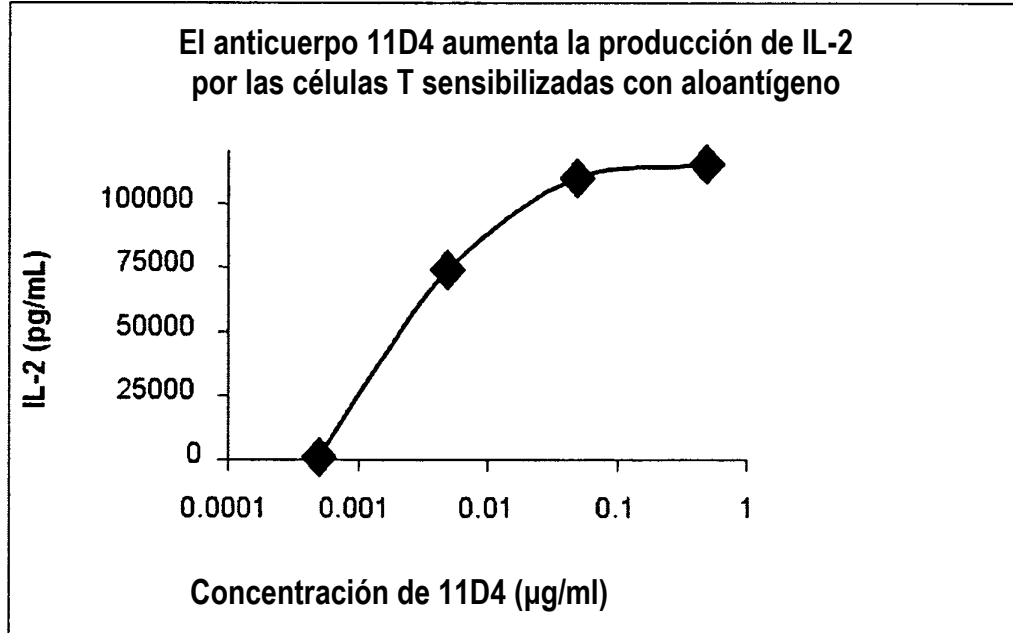


Figura 4.

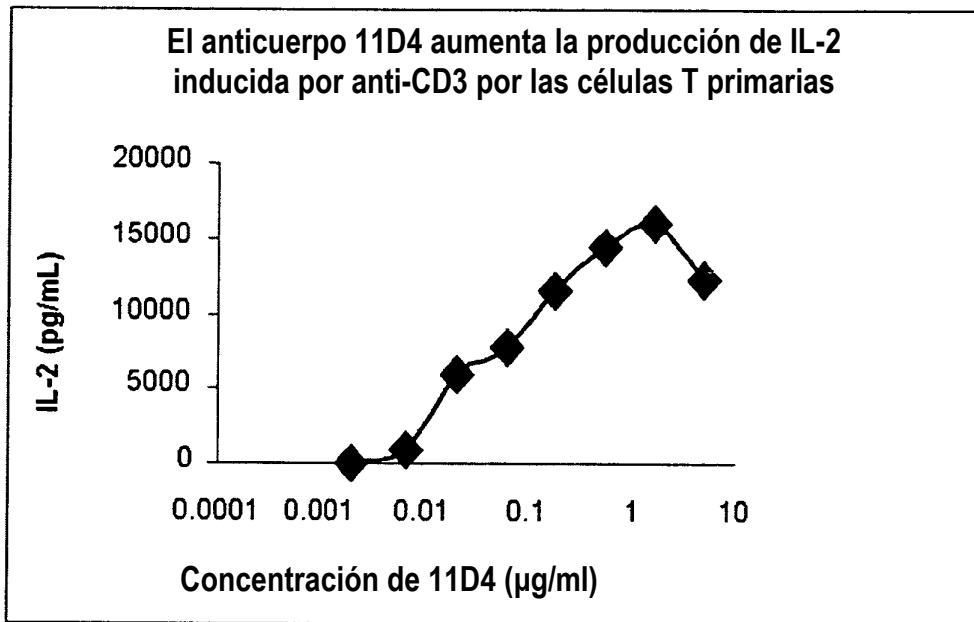


Figura 5.

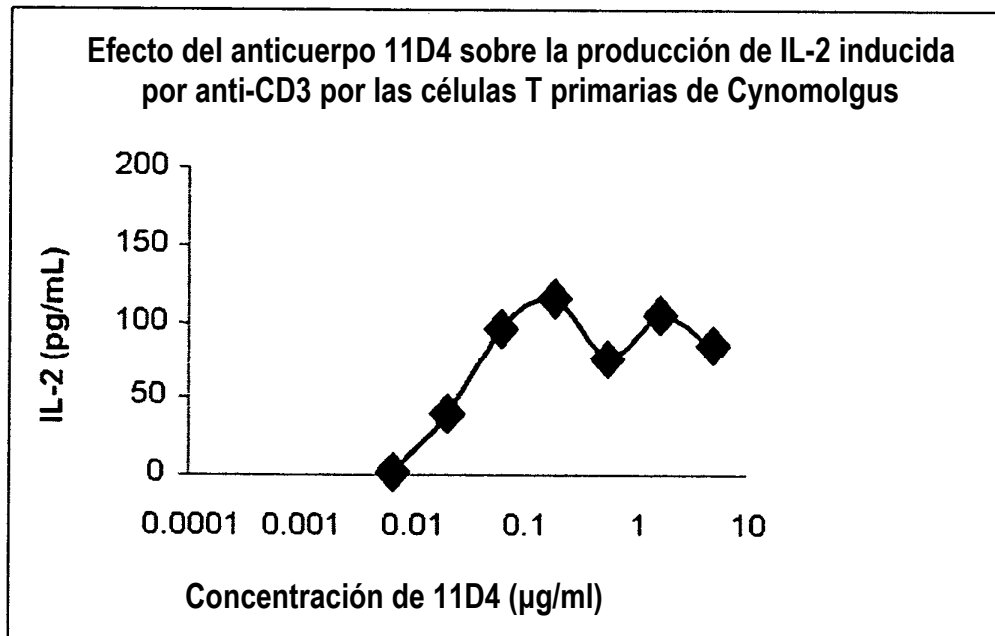


Figura 6.

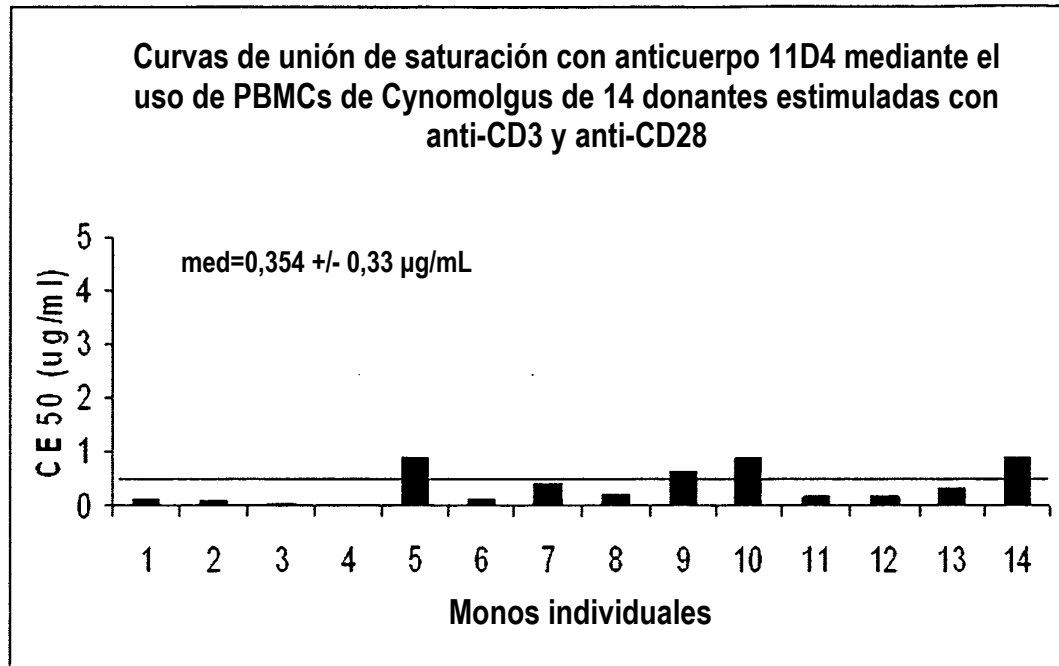


Figura 7.

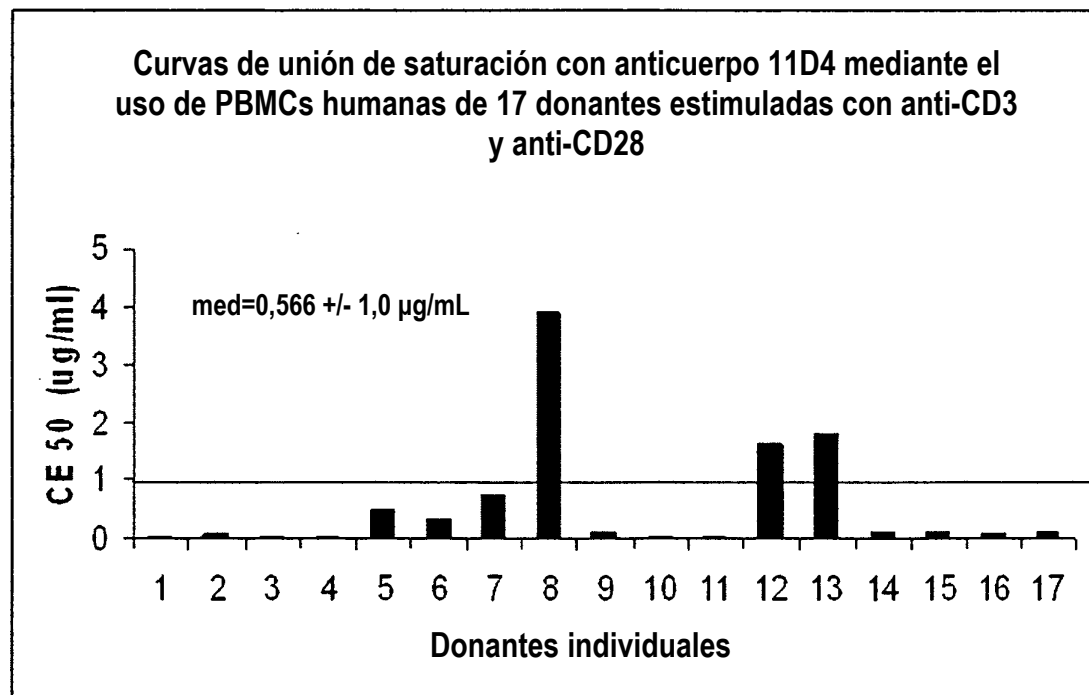


Figura 8.

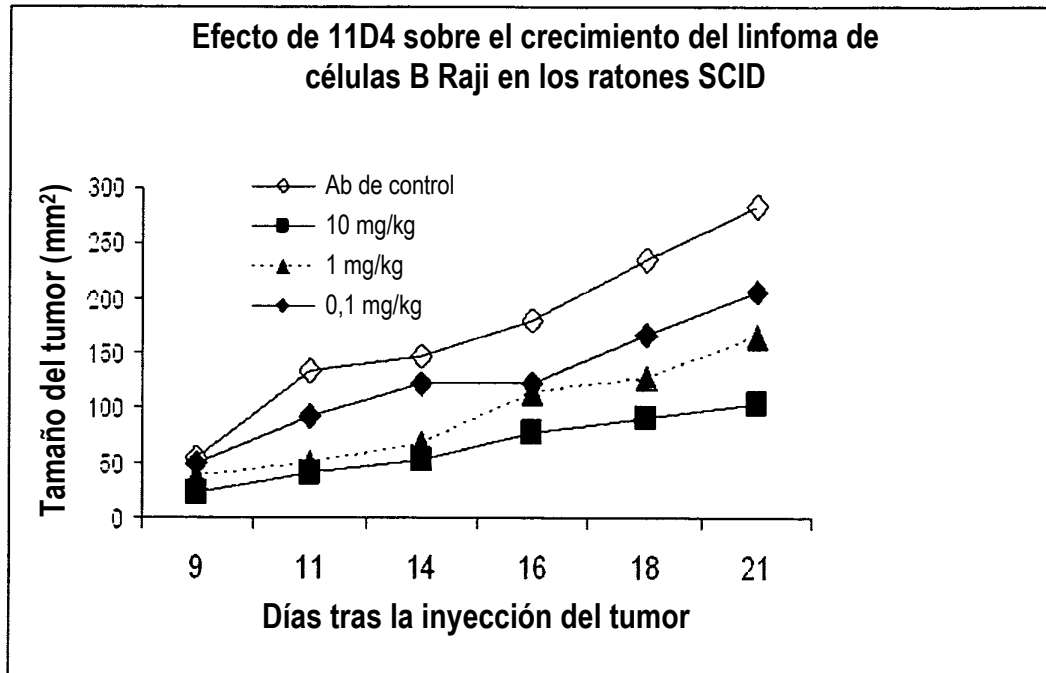


Figura 9.

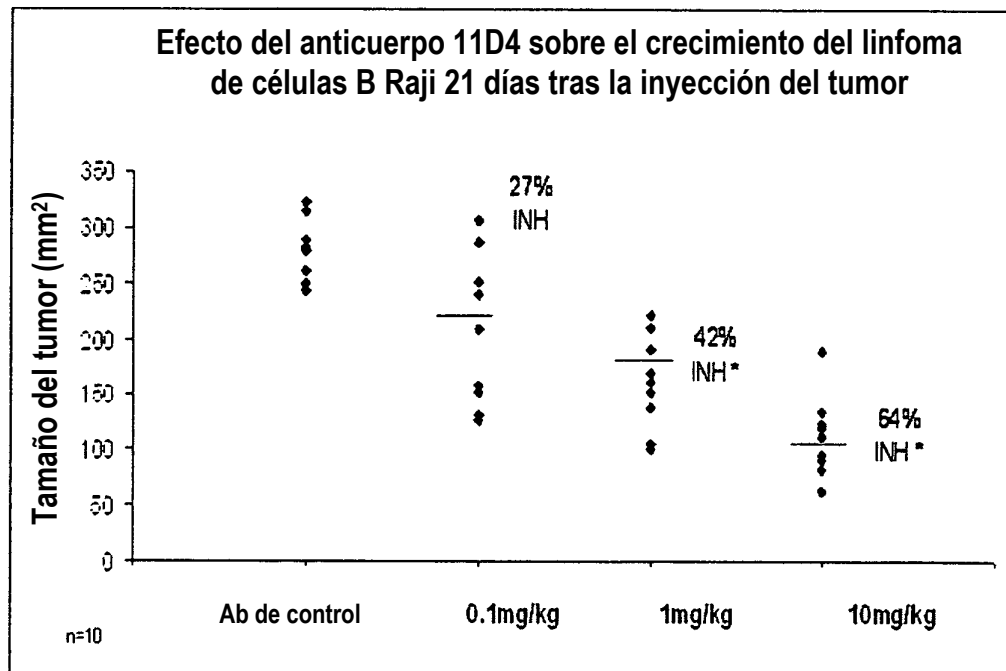


Figura 10.

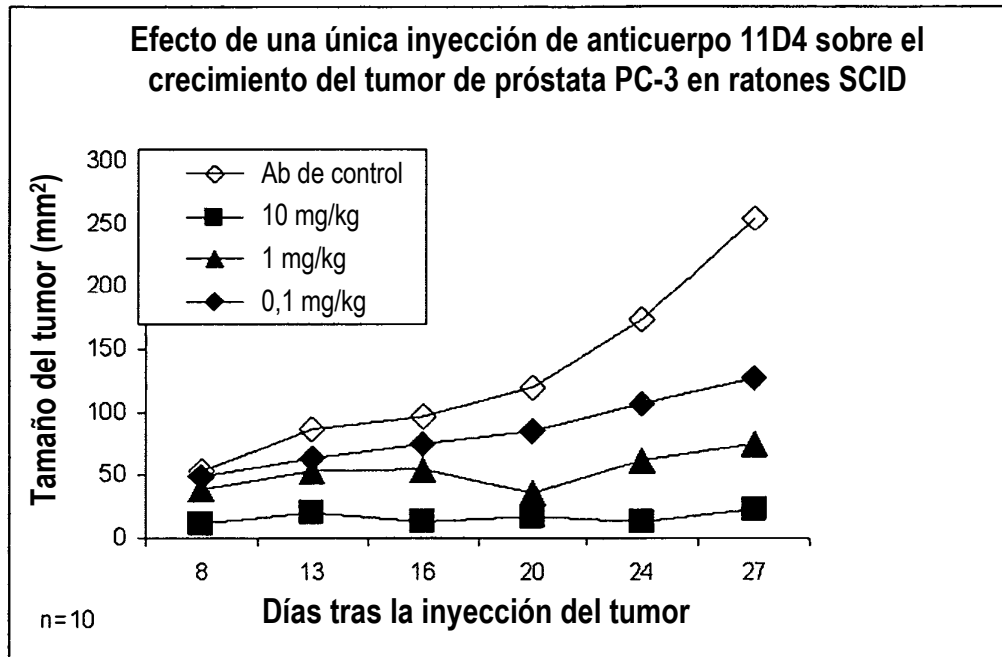


Figura 11.

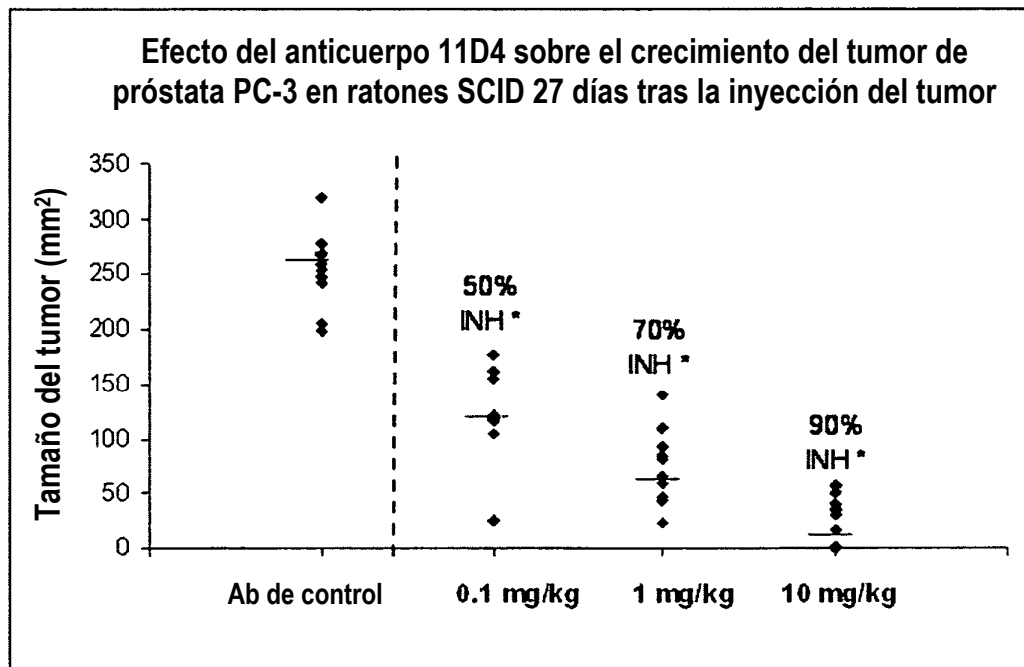


Figura 12.

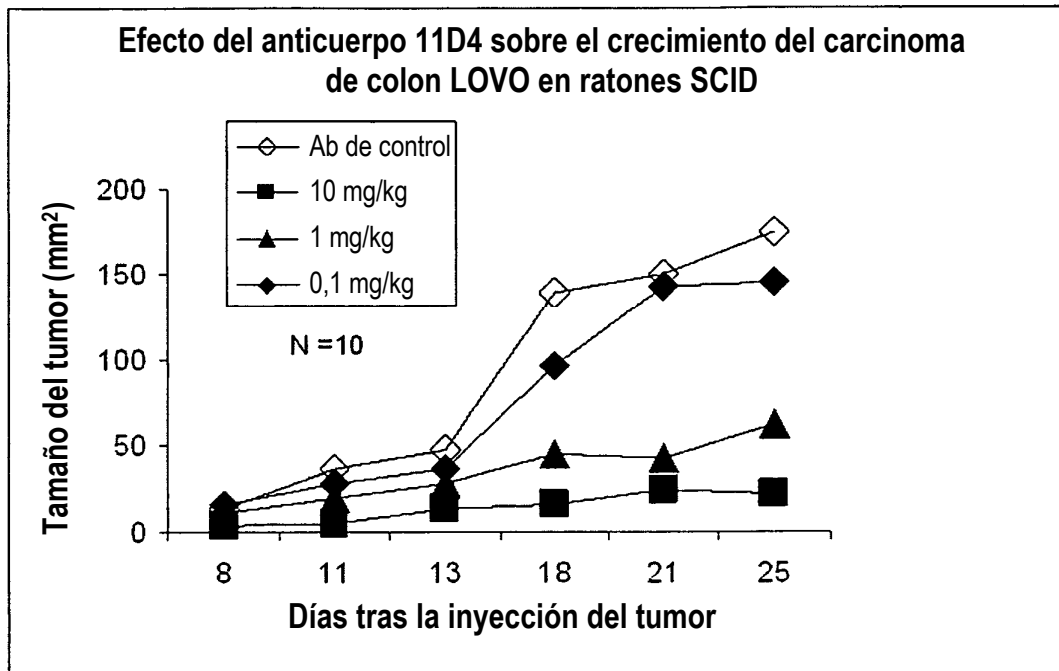


Figura 13.

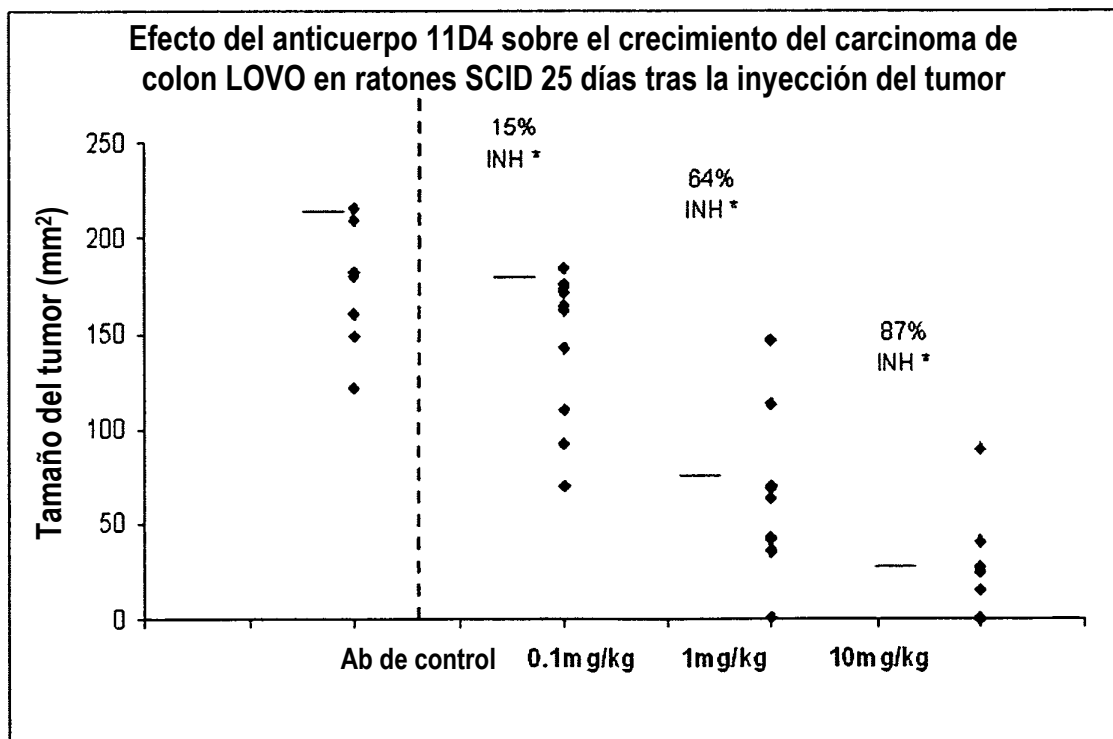


Figura 14.

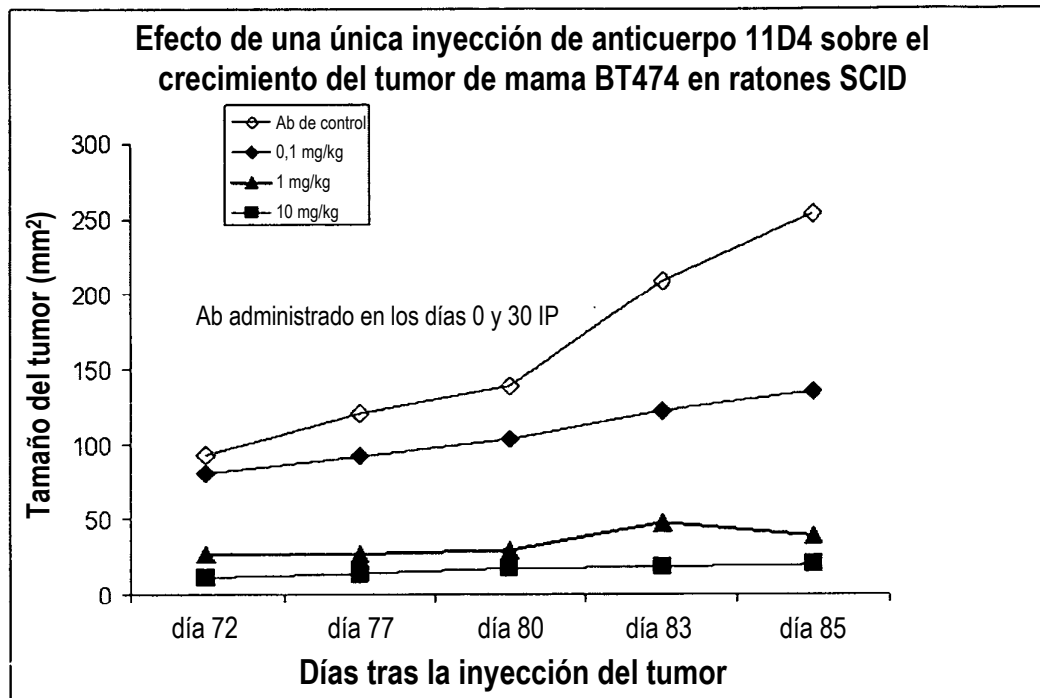


Figura 15.

